

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Vegetal I



TESIS DOCTORAL

**Acondicionamiento térmico: optimización de la tecnología de
conservación de melocotón**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Navarro Neila

Director

Jesús Alonso Sánchez

Madrid, 2017

©Sara Navarro Neila, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO;
OPTIMIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE CONSERVACIÓN
DE MELOCOTÓN

TESIS DOCTORAL
SARA NAVARRO NEILA
MADRID, 2016



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO;
OPTIMIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE CONSERVACIÓN
DE MELOCOTÓN

TESIS DOCTORAL
SARA NAVARRO NEILA
MADRID, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL

ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO;
OPTIMIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE CONSERVACIÓN
DE MELOCOTÓN

Memoria presentada por Sara Navarro Neila para optar al grado de Doctor por la
Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Trabajo realizado en el Departamento de Productos del Instituto de Ciencia y
Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) bajo la dirección del Doctor Jesús
Alonso Sánchez.

Vº Bº DEL DIRECTOR

LA DOCTORANDA

Jesús Alonso Sánchez

Sara Navarro Neila

TESIS DOCTORAL
SARA NAVARRO NEILA
MADRID, 2016

AGRADECIMIENTOS

Es muchísimo lo que tengo que agradecer después de un camino tan largo

A mi director de tesis, por la ilusión con la que comenzó este proyecto.

A Oscar, por su ayuda en todas y cada una de las etapas de este trabajo.

A CREX y TANY NATURE por abrirnos las grandes puertas de sus centrales.

A Isabel, por hacer también suyo el duro trabajo de campaña.

A Miguel Ángel, por llevarme de la mano en el mundo de los aromas.

A Marta, por quitarme el miedo a la 2D en solitario, a “las chicas de Ali” por fiarse de mí y cederme las llaves del labo de proteómica y a Felipe y Lola por ayudarme a darle nombre a lo que no era más que una nube de puntos.

A mis compañer@s del Frío (ICTAN); a Irene por no perderla nunca y a Patri porque el destino quiso que la volviera a recuperar.

A los compañer@s del INTAEX que acogieron a la madrileña cuando estaba lejos de casa.

A mis compañer@s del CBGP,

a l@s que están: Alberto, Alfonso, Álvaro, David, Encina, Gema, Inma, Iván, Juan y en especial a Bárbara por su latido en clave de sol, a Helen por ser un ejemplo para todos nosotr@s queriendo ser un@ más a pesar de estar a otro nivel. Y a Javier, por su buena karma o por su energía a secas.

a l@s que están creciendo fuera pero siguen presentes: Ángeles, Lauri, Laura, Leti, Mercedes, Nacho, Zamira y en especial a Ana y a Conchi por seguir tan cerca a pesar de estar tan lejos y a Silvi porque si no hubiera sido por ella no habría conocido el “lab 180”.

A Carlos, porque sin su generosidad no lo habría conseguido.

A Estrella, por su esfuerzo de revisión en el momento menos oportuno.

A Alejandra, Andrea, Belén y María por esperarme ahí fuera.

A tod@ los somoserranos con los que recorrí valles, bares y montañas y que me cargaron las pilas cuando parecía que una vez más iba a ser imposible.

A los Neila-Gonzalez por quererse y cuidarse tanto y por hacerme sentir tan orgullosa.

A mi hermana, por ser el espejo en el que siempre querré mirarme. Y a Cesar por ser para mí un ejemplo de valentía.

A mi madre, porque todavía no puedo explicarme como puede hacerlo taaaan bien. Y por los infinitos táper que me gustaría devolverle llenos a partir de ahora.

Y a ti sin duda, mi corazón charro.

A mi madre

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	11
1.1. Producción, exportación y consumo de melocotón en España.....	11
1.1.1. Datos de producción 2006 a 2013	11
1.1.2. Datos de exportación 2006 a 2013	13
1.1.3. Datos de consumo	14
1.2. Perecibilidad, refrigeración y problemas asociados	14
1.3. Tecnología postcosecha para disminuir los daños por frío	17
1.4. La importancia de cosechar en el momento óptimo de maduración	17
1.5. Una fruta de calidad sobre la mesa.....	19
2. OBJETIVOS	23
3. BLOQUE I:	27
ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO EN LAS VARIEDADES DE ESTUDIO; CARACTERIZACIÓN VARIETAL	27
3.1. INTRODUCCIÓN	27
3.1.1. MADURACIÓN.....	27
3.1.2. CONCEPTO DE CALIDAD.....	28
3.1.3. ÍNDICES DE CALIDAD.....	28
3.1.3.1. Acidez titulable	28
3.1.3.2. Grados brix o contenido en Sólidos Solubles (CSS)	29
3.1.3.3. Relación entre el contenido en sólidos solubles y la acidez titulable (CSS/AT).....	29
3.1.3.4. Firmeza de la pulpa.....	30
3.1.3.5. Color	30
3.1.3.6. Respiración	31
3.1.3.7. Etileno	32
3.1.4. REFRIGERACIÓN, DAÑOS POR FRÍO Y COMO PALIARLOS	33
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
3.2.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	35

3.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	36
3.2.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	36
3.2.3.1. Respiración y producción de etileno	36
3.2.3.2. Firmeza	36
3.2.3.3. Color	37
3.2.3.4. Acidez	38
3.2.3.5. Contenido en sólidos solubles (CSS)	38
3.2.3.6. Jugosidad	38
3.2.3.7. Identificación y cuantificación de daños (externos e internos)	38
3.2. 4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	38
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.3.1. ESTUDIO 1: CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIEDADES TRAS LA RECOLECCIÓN	39
3.3.2. ESTUDIO 2: CARACTERIZACIÓN VARIETAL DURANTE LA CONSERVACIÓN	44
3.3.2.1. ESTUDIO 2A: EFECTO DEL TIEMPO Y LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN FRIGORÍFICA EN LA EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD.	52
3.3.2.2. ESTUDIO 2B: EFECTO DEL TRATAMIENTO POSTCOSECHA (ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO) EN LA EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD.	54
4. BLOQUE II:	63
ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO Y AROMA	63
4.1. INTRODUCCIÓN	63
4.1.1. PREMADURACIÓN	63
4.1.2. AROMA.....	63
4.1.3. PREMADURACIÓN Y AROMA	65
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
4.2.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	67
4.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	67
4.2.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	67
4.2.3.1. Detección y cuantificación de volátiles con SPME (Microextracción en Fase Sólida)	67
4.2.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	68
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69

4.3.1. ESTUDIO 1: DESCRIPCIÓN DEL PERFIL DE AROMAS PARA CADA VARIEDAD EN EL MOMENTO DE LA COSECHA.....	69
4.3.2. ESTUDIO 2A: EVOLUCIÓN CUANTITATIVA DEL PERFIL DE EMISIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN CADA VARIEDAD.	71
4.3.4. ESTUDIO 2B: EVOLUCIÓN CUALITATIVA DEL PERFIL DE EMISIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN CADA VARIEDAD.	73
4.3.4. ESTUDIO 3: EFECTO DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN Y DEL TRATAMIENTO POSTCOSECHA EN LA EMISIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES.	75
4.3.4.1. Estudio 3A: Efecto de la temperatura de conservación y del tratamiento en la emisión de cada grupo químico de compuestos volátiles.....	75
.....	76
4.3.4.2. Estudio 3B: Efecto de la temperatura de conservación y del tratamiento en la emisión de cada compuesto volátil.....	78
Ésteres	80
Terpenos.....	81
Alcoholes	81
Alcanos	82
Compuestos aromáticos.....	82
Lactonas.....	83
Cetonas.....	84
5. BLOQUE III:	87
ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO Y EXPRESIÓN PROTEICA	87
5.1. INTRODUCCIÓN	87
5.1.1. SÍNTOMAS DE DAÑO POR FRÍO A NIVEL CELULAR	88
5.1.1.1. Integridad de las membranas celulares.....	88
5.1.1.2. Organización de la pared celular	89
5.1.1.3. En otros compartimentos celulares	90
5.1.2. RESPUESTA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS POR FRÍO	91
5.1.2.1. El estrés por frío y el Calcio	91
5.1.2.2. El estrés por frío y las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	91
5.1.2.3. El estrés por frío y los cambios a nivel del proteoma.....	93

5.1.2.4. El estrés por frío y su regulación hormonal	96
5.1.2.5. El estrés por frío y otros compuestos endógenos	98
5.1.3. PROTEÓMICA	100
5.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	105
5.2.1. EXTRACCIÓN	105
5.2.2. CUANTIFICACIÓN	106
5.2.3. MARCAJE CON FLUORÓFOROS DIGE.....	106
5.2.3.1. Diseño experimental	107
5.2.3.2. Preparación de los fluoróforos para un marcaje mínimo.....	108
5.2.4. PRIMERA DIMENSIÓN; ISOELECTROENFOQUE (IEE)	109
5.2.4.1. Re-hidratación de las tiras y carga de la muestra simultáneas	109
5.2.5. SEGUNDA DIMENSIÓN: SDS-PAGE	111
5.2.5.1. Equilibrado	111
5.2.5.2. sds-page	111
5.2.6. IMÁGENES DIGE	112
5.2.6.1. Digitalización de geles	112
5.2.6.2. Análisis de imágenes	112
5.2.6.3. Análisis PCA.....	114
5.2.7. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	114
5.2.7.1. Gel preparativo	114
5.2.7.2. Digestión de proteínas	115
5.2.7.3. Preparación de la muestra	115
5.2.7.4. Análisis de Huella peptídica y Fragmentación de péptidos.....	116
5.2.7.5. Identificación de proteínas.....	117
5.2.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	117
5.2.8.1. Clasificación ontológica; análisis de categorías funcionales (GO).....	117
5.2.8.2. Agrupamiento jerárquico (Hierarchical cluster)	118
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	119
5.3.1. Cuantificación y marcaje con fluoróforos dige	119
5.3.2. ESTUDIO 1: ESTUDIO DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL MEDIANTE DIGE.....	120

5.3.2.1. Comparaciones entre condiciones de interés.....	120
5.3.2.2. Tabla resumen de comparaciones	120
5.3.2.3. Localización en el gel de los spots diferenciales (POI).....	121
5.3.2.4. Análisis de PCA.....	122
5.3.3. ESTUDIO 2: IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DIFERENCIALES MEDIANTE HUELLA PEPTÍDICA Y FRAGMENTACIÓN DE PÉPTIDOS.....	124
5.3.4. ESTUDIO 1+2: IDENTIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PCA	125
5.3.5. ESTUDIO 3: ANÁLISIS DE CATEGORÍAS FUNCIONALES.	126
5.3.6. ESTUDIO 4: ANÁLISIS DE CLUSTER.....	129
5.3.7. ESTUDIO 5: ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA FRIGOCONSERVACIÓN, LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN FRIGORÍFICA Y EL TRATAMIENTO POSTCOSECHA, SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DIFERENCIALES.....	131
5.3.7.1. Efecto de la conservación.....	132
5.3.7.2. Efecto de la temperatura de conservación	132
5.3.7.3. Efecto del tratamiento postcosecha (acondicionamiento térmico).....	133
5.3.7.4. Análisis de resultados proteína a proteína	134
6. CONCLUSIONES	153
7. BIBLIOGRAFÍA	157
8. ANEXOS	177
ANEXO 1.	177
ANEXO 2-1, 2-2, 2-3, 2-4 Y 2-5.....	177
ANEXO 3-1 Y 3-2.	177
ANEXO 8.	177
ANEXO 9.	177
ANEXO 10.	177
ANEXO 4	179
ANEXO 5.	183
ANEXO 6.	203
ANEXO 7.	207

ABREVIATURAS

“: Segundos

1D: Primera dimensión= IEE: Isoelectroenfoque

2D: Segunda dimensión

a: Intensidad del rojo

ABA: Ácido abscísico

AEC: Carga energética de adenilato

AGI/AGS: Ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados

ALC: Alcanos

ANOVA: Análisis de Varianza

ANS: Antocianidina sintasa, también llamada leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX)

AOH: Alcoholes

AOX: Oxidasa alternativa

APS: Persulfato amónico

APX: Glutation peroxidasa

ARO: Compuestos aromáticos

AT: Acidez titulable

b: Intensidad del amarillo

BIORAD: Biorad Laboratories, California, USA

BSA: Albúmina de suero bovino

C: Control; fruto no tratado

C0: Control a 0°C

C5: Control a 5°C

CAT: Catalasa

CBF: Factor de transcripción (del inglés “*core binding factor*”)

CET: Cetonas

CG-MS: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato hidratado

CI: Daño por frío (del inglés “*chilling injury*”)

CIELAB: CIE L*a*b* (CIELAB) es el modelo cromático usado normalmente para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano. Fue desarrollado específicamente con este propósito por la Comisión Internacional de la Iluminación (Commission Internationale d’Eclairage), razón

por la cual se abrevia CIE. Los asteriscos (*) que siguen a cada letra forman parte del nombre, ya que representan L^* , a^* y b^* , de L , a y b .

CSS: Contenido en Sólidos Solubles

CyDyes: del inglés "*Cianine minimal Dyes*"

DHAR: Dehidroascorbato reductasa

DIGE: Electroforesis diferencial en gel (del inglés "*Difference Gel Electrophoresis*")

DMF: N,N-Dimetilformamida

DREB: factor de transcripción del inglés "*dehydration responsive element binding protein*")

DS: (del inglés "*Delayed Storage*"); frutos tratados con acondicionamiento térmico

DS0: tratado a 0°C

DS5: tratado a 5°C

DTT: DL-Ditiotreitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

EST: Ésteres

FADs: Ácido graso desaturasa

fw: Peso fresco (del inglés "*fresh weight*")

g: Gramo o Unidad de fuerza en centrifugación

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GA y GA3: Giberelina

GE: GE Healthcare, Madrid, Spain

GFP: Proteína Verde Fluorescente (del inglés: "*Green Fluorescent Protein*")

GO: del inglés "*Gene Ontology*"

GPX: Glutathion peroxidasa

GR: Glutathion reductasa

GST: Glutathion S transferasa

HR: Humedad relativa

HT: Tratamiento térmico postcosecha

HSP: proteínas de choque térmico (del inglés "*Heat Shock Protein*")

IAA: Ácido indolacético (auxina)

IDP/IUP: proteína intrínsecamente desorganizada o desestructurada (del inglés "*intrinsically disordered/unstructured proteins*")

IEE (IEF): Isoelectroenfoque (del inglés "*Isoelectric Focusing*")

INI: Inicial

Índice croma: Grado de saturación del color rojo

Índice hue: Nivel del color amarillo/tono

IR: Intensidad respiratoria JA: Ácido jasmónico

kDa: kiloDalton

L: Luminosidad

LAC: Lactonas

LOX : Lipoxigenasa

LSD: Mínima Diferencia Significativa (del inglés "*Least Significant Difference*")

MALDI: Ionización/desorción con láser asistida con matriz (del inglés "*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*")

MAPK o Vía MAP-quinasa (del inglés "*Mitogen Activated Protein Kinases*")

MDA: Malonil dialdehído

MeJA: Metil jasmonato

min: Minutos

m/z: Masa/carga

MQ: Agua Milli Q

MS: Espectrometría de masas (del inglés "*Mass Spectrometry*")

MS-MS= MS²: Espectrometría de masas en tandem

o/n: del inglés "*over night*"

OTH: Umbral olfativo (del inglés "*Odor threshold*")

PAGE-SDS: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

PCA: Análisis de Componentes Principales (del inglés "*Principal Component Analysis*")

pI: Punto isoelectrico

PLD: Fosfolipasa D

PM: Peso Molecular

PMSF: Fenil metanosulfonil fluoruro

POD: Peroxidasa

POI: Proteína de interés o diferencial en DIGE

ppb: Partes por billón

PPO: Polifenol oxidasa

ppm: Partes por millón

PR: Proteínas relacionadas con la patogénesis

Put: Putrescina

ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés "*Reactive Oxygen Species*")

s: Semana

SA: Ácido salicílico

SDS: Dodecil sulfato sódico

SE: Error estándar

smHSP: HSP de bajo PM C

SOD: Superoxido dismutasa

Spd: Espermidina

Spm: Espermina

SPME: Microextracción en fase sólida (MEFS)

T: Temperatura

TEMED: 1,2-Bis (dimetilamino)etano

TF: Factor de transcripción

TOF: Tiempo de vuelo (del inglés "Time of Flight")

TRIS: 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

TRP: Terpenos

RESUMEN

La fruta de hueso es un producto altamente perecedero y tiene un potencial de vida de mercado limitado. La conservación frigorífica (entre -1 y +2 °C) es la principal tecnología utilizada para retrasar la maduración postcosecha del fruto, ralentizar su deterioro y mantener la calidad y el valor nutricional, ya que implica una reducción de su tasa metabólica y respiratoria. Sin embargo, la aparición de los desórdenes fisiológicos conocidos genéricamente con el nombre de “daños por frío” se debe principalmente al uso de un rango de temperatura que varía entre 2,2 y 7,8 °C durante la conservación frigorífica. El control de la temperatura del producto y la reducción del tiempo en el que el producto permanece a temperaturas distintas a las óptimas, son los métodos más importantes para reducir las pérdidas de calidad. Además se ha probado que el acondicionamiento térmico en fruta de hueso es un tratamiento postcosecha que retrasa y limita el desarrollo de este desorden.

Por ello, el objetivo principal de este tesis es profundizar en los posibles beneficios de la aplicación de un protocolo de acondicionamiento térmico en la conservación de variedades de elevado interés comercial en la zona productora de las Vegas Altas del Guadiana (Badajoz), con la finalidad de optimizar su conservación, incrementar su calidad y aceptación de consumo y mejorar por tanto su comercialización.

De los resultados de este trabajo se concluye principalmente que el acondicionamiento térmico a 20°C puede ser una estrategia eficaz para disminuir el desarrollo de fisiopatías, así como para incrementar la vida útil en algunos cultivares como “Royal Glory” y “Sum 67”, siendo muy variable su eficacia entre cultivares. El protocolo de premaduración utilizado fue muy eficaz en disminuir la “harinosidad” desarrollada en los frutos de las variedades “Ruby Rich” y “Elegant Lady” conservados a 5°C, así como el desarrollo de “pulpa seca” en los frutos de las variedades “Ruby Rich”, “Elegant Lady” y “Alejandro Dumas” conservados a 0°C. Además el acondicionamiento térmico mejora la calidad organoléptica de las variedades “Royal glory” y “Elegant Lady”, incrementando los niveles de diversos compuestos considerados indicadores de maduración, como son los ésteres y de compuestos responsables del aroma característico del melocotón como son las lactonas. Un análisis proteómico comparativo ha revelado que el acondicionamiento térmico, en la variedad sensible “Elegant Lady” reduce los niveles de la proteína de estrés por deshidratación P216-Dehidrina. Así mismo, incrementa los niveles de las proteínas termotolerantes P89-taumatina y P981-quitinasa y de la proteína P1303-1312-Bet v I respecto a frutos no tratados en esta variedad.

Parece por tanto que el acondicionamiento térmico a 20°C es una herramienta efectiva para incrementar la calidad y aceptación de consumo y que favorece la adquisición de resistencia al frío en melocotón.

SUMMARY

Stone fruits are highly perishable and have a limited market life. Cold storage (between -1 and +2 °C) is the main technology used to delay postharvest fruit ripening, slow down its deterioration and maintain its quality and nutritional value, as it involves a reduction in metabolic and respiratory rate. However, the appearance of physiological disorders known under the name of "chilling injury" is mainly due to the use of a temperature range that varies between 2.2 and 7.8 °C during cold storage. Controlling the temperature of the product and reducing the time that the product remains at suboptimal temperatures are the most important methods to reduce loss of quality. It has also been proven that the preconditioning treatment of stone fruits is a postharvest treatment that delays and limits the appearance of this disorder.

Therefore, the main objective of this thesis is to examine the potential benefits of implementing a preconditioning treatment protocol in the preservation of varieties of high commercial interest in the producing area of the Vegas Altas del Guadiana (Badajoz), in order to optimize their conservation, increase quality and consumer acceptance and thereby improve their marketing.

From the results of this work it is concluded that the preconditioning treatment at 20°C can be an effective strategy to reduce the appearance of physiological disorders and increase the life in some cultivars such as "Royal Glory" and "Sum 67", with highly variable efficacy among varieties. The preconditioning treatment protocol used was very effective in reducing "mealiness" developed in "Ruby Rich" and "Elegant Lady" fruits stored at 5°C, as well as the development of "leatheriness" in "Royal glory", "Sum 67" and "Alejandro Dumas" fruits stored at 0°C. Also, the preconditioning treatment improves the organoleptic quality of the "Royal glory" and "Elegant Lady" varieties, increasing the levels of maturation indicators such as esters and other compounds that account for the aroma of peach, like lactones. A comparative proteomic analysis has revealed that the preconditioning treatment in the sensitive variety "Elegant Lady" reduces the levels of the dehydration stress protein P216-dehydrin. It also increases the levels of the thermotolerant proteins P89-thaumatococcus and P981-chitinase and protein P1303/1312-Bet v I compared to untreated fruits of the sensitive variety "Elegant Lady".

Thus, it appears that a preconditioning treatment at 20°C is an effective tool to increase quality and consumer acceptance, and to promote the acquisition of cold hardiness in peach.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El melocotonero *Prunus persica* (L.) Batsch pertenece a la familia de las rosáceas (*Rosaceae*). Se cree que es originario de China (Salunkhe & Desai, 1984), donde las referencias de su cultivo en la literatura se remontan al año 1000 a. C. Fueron llevados probablemente a Persia a través de las rutas comerciales por las montañas, llegando a ser conocidos allí como “manzana persa”, de ahí su nombre latino. Hacia el año 330 a. C. los melocotones llegaron a Grecia y durante la Edad Media su cultivo se extendió por toda Europa. El nombre castellano de melocotón deriva de las palabras latinas *malum*: manzana y en general todo tipo de frutos, y *cotoni*: membrillo, por ser peloso como este (López Gonzalez, 2002). En el siglo XVI se estableció en México y en el siglo XVIII en California (Lurie & Crisosto, 2005). En el siglo XIX se constata como cultivo en expansión. A principios del siglo XX se empiezan a seleccionar genotipos de melocotonero a partir de poblaciones procedentes de semilla y se fijan por medio de injerto, siendo uno de los frutales más difundido en todo el mundo.

1.1. PRODUCCIÓN, EXPORTACIÓN Y CONSUMO DE MELOCOTÓN EN ESPAÑA

España es el segundo país productor y el primer exportador a nivel europeo.

1.1.1. DATOS DE PRODUCCIÓN 2006 A 2013

Según (“FAOSTAT,” 2016) los principales países productores son China, Italia, España, EEUU y Grecia (Fig. 1 y 2).

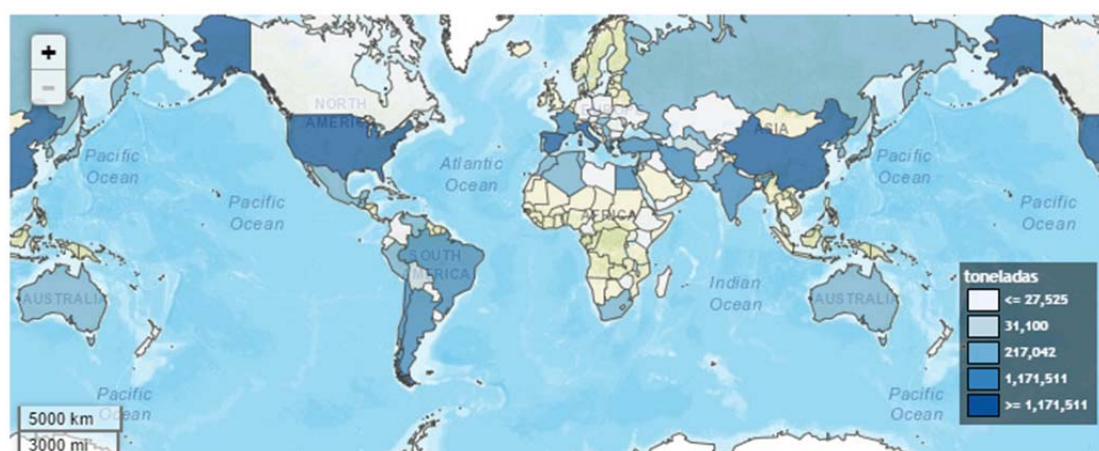


Figura 1: Producción mundial de melocotón. Cantidades promedio de cada país en el periodo 2006-13.

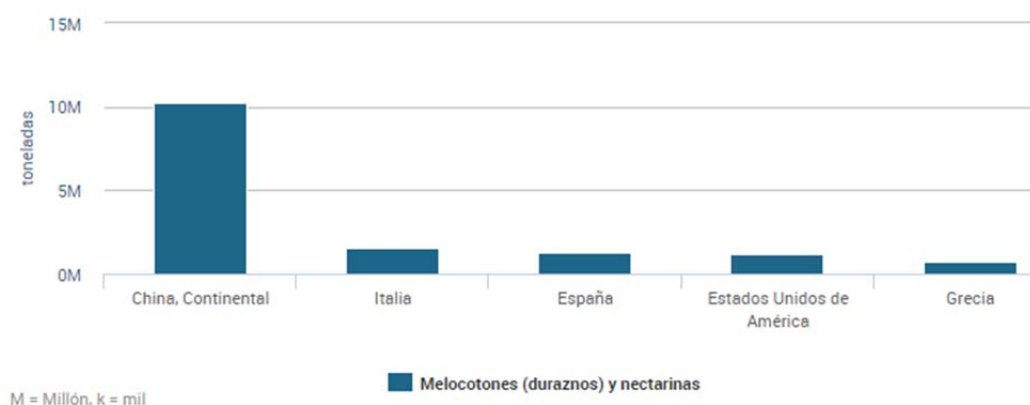


Figura 2: Producción de melocotón de los 5 principales productores. Cantidades promedio 2006-2013.

España es el segundo país productor de melocotón de la UE (Fig. 2).

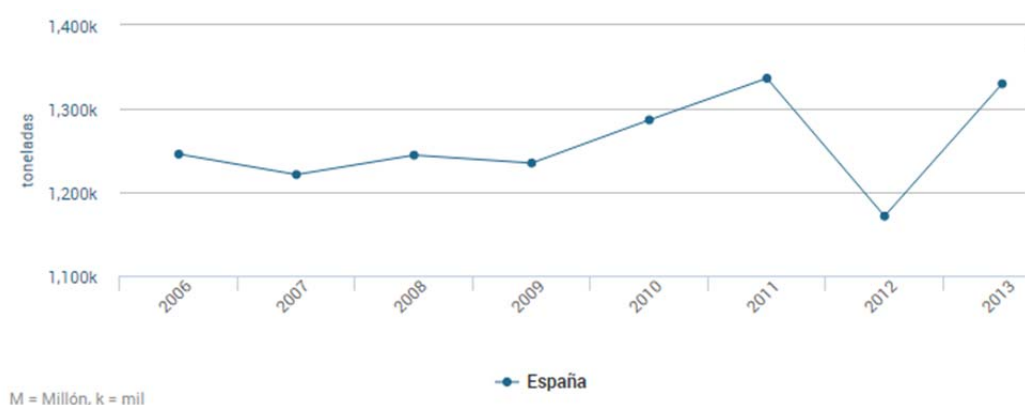


Figura 3: Producción de melocotón en España. Cantidades promedio 2006-2013.

La producción española de los últimos años sigue estabilizada en torno a 1.100.000 Tm (Fig. 3), con una superficie cultivada que se aproxima a las 80.000 ha, lo que convierte al melocotón en la fruta dulce con mayor producción (29%). Esta especie cubre una gran diversidad de áreas de producción y de disponibilidad de horas de frío, lo que se traduce en un amplio calendario de recolección que abarca desde mediados de abril hasta finales de octubre. Todas las zonas productoras se caracterizan por climas secos y calurosos. Su floración, más precoz respecto al manzano, peral o cerezo, incrementa el riesgo de heladas, en particular en variedades de floración temprana. Para disminuir este riesgo y buscar un extra de precocidad, el cultivo se ha desplazado progresivamente hacia el sur hace ya más de una década, a cambio de un importante incremento de los costes de producción. Esto ha sido posible gracias a la

introducción de nuevas variedades de bajo reposo invernal o “low chilling”. (Iglesias Castellarnau & Casals Pelegrí, 2014)

1.1.2. DATOS DE EXPORTACIÓN 2006 A 2013

En la actualidad y desde 2005 España se convirtió en el primer país exportador de melocotón de la UE, a notable distancia de Italia, ofreciendo una amplia gama de variedades y tipologías de fruto que cubren un largo período de recolección/comercialización (Iglesias Castellarnau & Casals Pelegrí, 2014). En 2013 España exportó el 56% de su producción (Fig. 4) (“FAOSTAT,” 2016).

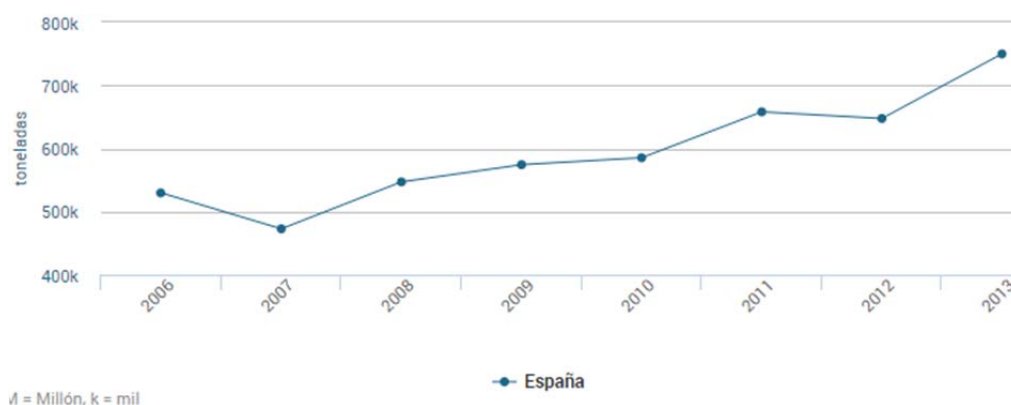


Figura 4: Exportación de melocotón en España. Cantidades promedio 2006-2013.

Los principales destinos de los melocotones y nectarinas españolas fueron los países de la Unión Europea, destacando por encima de todos Alemania y Francia, y en menor medida, Italia, Portugal, Reino Unido y Bélgica. También incrementaron de forma destacable e interesante los envíos hacia países del este europeo (Rusia, Polonia, Lituania, Bielorrusia, etc.), norte de África (Argelia) o de Sudamérica (Brasil), que a la vez presentan un potencial futuro (Iglesias Castellarnau & Casals Pelegrí, 2014). El pasado mes de abril, España y China han firmado en Pekín un protocolo que permitirá las exportaciones de melocotones y ciruelas españolas a los mercados chinos. España se convierte así en el primer país del mundo autorizado a exportar melocotones a este mercado.

Las oportunidades potenciales del mercado de exportación, combinado con el deseo de almacenar algunos cultivares de estación tardía para alargar su periodo de comercialización, está incrementando el interés en los procedimientos para extender la vida postcosecha.

1.1.3. DATOS DE CONSUMO

El consumo de melocotón en España es muy bajo si se tiene en cuenta que es el segundo productor de la UE y que cuenta con precios para el consumidor muy inferiores a los de los países de exportación. En la actualidad se sitúa en quinto lugar después de Italia (22 kg per cápita y año), Grecia, Portugal y Francia. Pero el hecho más preocupante es su tendencia a la disminución desde 1989 (Iglesias Castellarnau & Casals Pelegrí, 2014).

Se han realizado numerosos estudios sobre las causas del bajo consumo, ya que supone una importante amenaza para el futuro, por la importancia del mercado interno (más en época estival) y la mayor vulnerabilidad de las exportaciones. De entre las más importantes se destacan el desconocimiento de las preferencias del consumidor y la insuficiente calidad de los frutos en destino, generalmente con firmeza excesiva y con un grado de madurez alejado de la madurez de consumo ideal para optimizar el sabor. Todo ello ha conducido a la falta de satisfacción para el consumidor y a la desincentivación de su consumo (Iglesias Castellarnau & Casals Pelegrí, 2014).

1.2. PERECIBILIDAD, REFRIGERACIÓN Y PROBLEMAS ASOCIADOS

La fruta de hueso es altamente perecedera y tienen un potencial de vida de mercado limitado (Robertson et al., 1990). El control de la temperatura del producto y la reducción del tiempo en el que el producto permanece a temperaturas distintas a las óptimas son los métodos más importantes para reducir las pérdidas de calidad. La conservación frigorífica (entre -1 y +2 °C) es la principal tecnología utilizada para retrasar la maduración postcosecha del fruto, ralentizar su deterioro y mantener la calidad y el valor nutricional, ya que implica una reducción de su tasa metabólica y respiratoria (Lurie & Crisosto, 2005). Es importante tener en cuenta que el potencial de conservación frigorífica dependerá de la variedad y que el control de la temperatura postcosecha del producto comienza con la planificación de la cosecha y su manejo en el campo.

Las causas de deterioro son variadas; pérdidas de agua, daños mecánicos, podredumbres y principalmente daño por frío (Kader, 2007).

Una pérdida de 5 al 8% del contenido de agua puede causar *marchitez* visual en melocotón. El cepillado del fruto incrementa la pérdida de agua mientras que la aplicación de ceras y recubrimientos comestibles, el enfriado rápido tras la cosecha y una elevada humedad relativa (HR) durante la frigoconservación, son las principales formas de limitar estas pérdidas.

El *daño mecánico* puede producirse por impacto, compresión, abrasión o vibración. Es importante un manejo cuidadoso durante la cosecha, el transporte y selección en la central hortofrutícola para minimizar tales daños ya que estos derivan en una apariencia de calidad reducida, una actividad fisiológica acelerada, un mayor potencial de inoculación de microorganismos que dan lugar a podredumbres y una mayor pérdida de agua.

Las *podredumbres* están causadas principalmente por el hongo *Botrytis cinérea* Pers.:Fr.. En España no está permitida la aplicación de fungicidas con lo que debe ponerse especial énfasis en el enfriamiento rápido tras la cosecha y extremarse el cuidado en el manejo de la fruta durante la recolección y postcosecha para evitar daños mecánicos y minimizar así estas incidencias.

El *DAÑO POR FRÍO*, también llamado “*desintegración interna*” o “*chilling injury*”, es la principal causa de deterioro de la fruta de hueso. Se produce cuando la fruta se somete a conservación frigorífica a temperaturas entre 2,2 y 7,8°C (Crisosto et al., 1999; Crisosto & Labavitch, 2002; Lurie & Crisosto, 2005). Los síntomas de este desorden son diversos. Los detectables con mayor facilidad, se producen en el mesocarpo de los frutos y podrían resumirse en:

- Desordenes en la textura;
 - o Caída brusca de la firmeza:

Diferenciaremos entre frutos de pulpa fundente “melting flesh” y pulpa no fundente “non-melting flesh”
 - o Disminución de la jugosidad de la pulpa acompañada de una textura que puede ser harinosa (“mealiness”), fibrosa o lanosa (“woollynes”) o dura (“leatheriness”)
 - Harinosidad y lanosidad: la pulpa de los frutos afectados pierde jugosidad y brillo y se torna pastosa y seca. La pulpa se disgrega totalmente y no ofrece ninguna resistencia al texturómetro.
 - Textura de cuero: la pulpa de los frutos afectados cambia su apariencia resbaladiza y jugosa a un tejido firme, seco y más consistente. Esto se traduce en una alta resistencia al ingreso del texturómetro hasta el punto en que bruscamente el émbolo logra penetrar en la pulpa. Al tacto, este tipo de textura se asemeja al cuero, mostrando cierta plasticidad.
- Desordenes en la coloración;

- Oscurecimiento o pardeamiento interno (“internal browning”):
 Los primeros síntomas se manifiestan como leves punteaduras marrones que se desarrollan en la pulpa justo por debajo de la piel, (aunque a veces también se origina en las proximidades del hueso). Con el tiempo, los tejidos dañados se tornan más oscuros y secos, y llegan a comprometer la totalidad de la pulpa
- Intenso color rojo en la pulpa (“bleeding o reddening”) el cual generalmente se irradia desde la semilla.

- Pulpa translúcida (“gel breakdown”):

Este síntoma afecta principalmente a ciruelas, y en menor medida a melocotón y nectarinas. Los síntomas comienzan alrededor del hueso y luego se extienden hacia la periferia, y pueden llegar a afectar grandes zonas de la pulpa. Se desarrollan áreas de bordes y formas irregulares con textura gelatinosa y una apariencia típicamente translúcida, acuosa y vítrea. Inicialmente, las zonas afectadas mantienen el color normal de la pulpa, aunque con el transcurso del tiempo es normal que se oscurezcan y alcancen colores pardos. Los melocotón y nectarinas toman una coloración verde oliva oscuro que puede estar acompañado de un ligero pardeamiento o enrojecimiento.

Además, en la mayoría de los casos, el aroma se pierde antes que los síntomas visuales sean evidentes.

No obstante, hay una gran variabilidad en la susceptibilidad al daño por frío entre especies próximas y dentro de una misma especie entre variedades. En general, melocotón es más susceptible que otras frutas de hueso como la nectarina y la ciruela.

Por tanto, si el cultivar es susceptible a este desorden y durante su conservación o transporte es expuesto al rango de temperatura 2,2-7,8°C, la vida postcosecha del fruto puede verse reducida significativamente.

1.3. TECNOLOGÍA POSTCOSECHA PARA DISMINUIR LOS DAÑOS POR FRÍO

Se han desarrollado y aplicado distintos tratamientos para ralentizar y limitar el desarrollo del daño por frío en fruta de hueso. Los principales son:

- La conservación en atmósfera controlada (AC) con bajas concentraciones de O₂ y altas concentraciones de CO₂. Su eficacia depende de la vida de comercialización del cultivar, la madurez, el tiempo de frigoconservación y el tamaño de la fruta.
- El “acondicionamiento térmico”, “pre-maduración”, “retraso en el almacenamiento frigorífico” o “prealmacenamiento”. Es un tratamiento postcosecha ya utilizado comercialmente en EEUU que consiste en el almacenamiento a 20°C durante un máximo de 48 horas después de la cosecha y antes de su conservación frigorífica (Nanos & Mitchell, 1991; Zhou et al., 2000; Crisosto, 2004). Aunque este tratamiento puede producir pérdida de peso y ablandamiento, no suele tener ningún efecto negativo sobre la calidad ni en melocotón ni en nectarina (Lurie & Crisosto, 2005). Además, se ha demostrado que los melocotones sometidos a acondicionamiento térmico a 20°C previo a su conservación frigorífica, mantienen sus cualidades sensoriales durante más tiempo respecto a los frutos directamente frigoconservados (Infante et al., 2009). Sin embargo, si el acondicionamiento térmico no se controla adecuadamente, se puede producir un excesivo ablandamiento de la pulpa disminuyendo la calidad de la fruta (Girardi et al., 2005). Al igual que ocurría con el tratamiento en atmósferas controladas, la eficacia de este tratamiento depende de la variedad y también del tiempo de acondicionamiento térmico.

1.4. LA IMPORTANCIA DE COSECHAR EN EL MOMENTO ÓPTIMO DE MADURACIÓN

La madurez de los frutos en el momento de la cosecha afectará a su “vida de mercado”, “vida útil” o “shelf life”. Afectará a su calidad y a su capacidad para madurar y condicionará la forma en la que los frutos deben ser manejados, transportados y comercializados.

En fisiología postcosecha, madurez fisiológica (*mature*) y madurez de consumo (*ripe*) son términos distintos. La madurez fisiológica es el estado en el cual el producto ha alcanzado un desarrollo suficiente para que, después de la cosecha y manejo postcosecha (incluyendo la maduración, cuando se requiera), su calidad sea al menos la mínima aceptable para el consumidor final. La madurez de consumo, también llamada madurez organoléptica es el

estado de desarrollo del fruto que reúne las características sensoriales deseables por el consumidor (color, sabor, aroma, textura, composición interna). El índice de madurez para un producto dado es una medida o medidas que pueden utilizarse para determinar si un producto en particular posee la madurez fisiológica requerida para su cosecha y óptima comercialización. Deben ser medidas objetivas, fáciles de aplicar en campo, de relativamente bajo coste y a ser posible no destructivas (Kader, 2007).

La maduración de un fruto implicará una serie de cambios que serán deseables o no en función del producto:

- La pérdida de clorofila (color verde) es deseable en frutas pero no en hortalizas.
- El desarrollo de carotenoides (colores amarillo y anaranjado) es deseable en fruta de hueso y otras frutas y en hortalizas como el tomate.
- El desarrollo de antocianinas (colores rojo y azul) y otros compuestos fenólicos que pueden dar lugar al oscurecimiento del tejido, lo cual es indeseable para la calidad de apariencia en unas frutas pero deseable en otras, como es el caso de la uva o la fresa.
- Los cambios en carbohidratos incluyen la conversión de almidón en azúcar (indeseable en patata, deseable en manzana, plátano y otras frutas); la conversión de azúcar en almidón (indeseable en guisante; deseable en patata); y la conversión de almidón y azúcar en CO_2 y agua a través de la respiración. La degradación de las pectinas y otros polisacáridos da como resultado el ablandamiento de la fruta y el consecuente incremento en la susceptibilidad al daño mecánico.
- Los cambios en los ácidos orgánicos, proteínas, amino ácidos y lípidos pueden influir en la calidad del sabor del producto. Las pérdidas en el contenido de vitaminas, especialmente de ácido ascórbico (Vitamina C) van en detrimento de su calidad nutricional. La producción de volátiles responsables del aroma durante la maduración de consumo es muy importante para su calidad organoléptica (Kader, 2007).

La fruta de hueso que se cosecha muy pronto (inmadura) puede tener problemas para madurar adecuadamente o pueden madurar anormalmente. La fruta inmadura se ablanda lenta e irregularmente, nunca alcanza la textura deseada de fruta completamente madura y el color verde de fondo de la piel puede no desaparecer completamente. La fruta cosechada inmadura tiene un contenido más bajo en sólidos solubles y más alto en ácidos respecto a la fruta madurada adecuadamente y esto contribuye a un desarrollo inadecuado del aroma. Debido a que a la fruta inmadura le falta un desarrollo completo de la cutícula, es más susceptible a la pérdida de agua y a la abrasión. También es más susceptible al desarrollo de los síntomas de daño por frío en comparación con la fruta madurada adecuadamente.

La fruta de hueso que se cosecha demasiado tarde (sobremadura) tiene una vida postcosecha más corta. El ablandamiento de la pulpa la hace susceptible al daño mecánico y al desarrollo de podredumbres. Por todo ello cuando esta fruta llegue al consumidor su calidad organoléptica será pobre e incluso puede mostrar signos de deterioro.

La madurez óptima para la cosecha de las frutas de hueso debe estar definida para cada uno de los cultivares. La máxima madurez a la que un cultivar puede ser recolectado con éxito está limitada por el manejo postcosecha (Kader, 2007).

Zhou y colaboradores (2001) sugirieron que el retraso en el almacenamiento frigorífico permitía iniciar la maduración y su continuación durante la frigoconservación, previniendo así la inhibición de la maduración tan frecuente en frutos directamente frigoconservados.

1.5. UNA FRUTA DE CALIDAD SOBRE LA MESA

La firmeza de la pulpa es el mejor indicador de la maduración en la fruta de hueso y un buen predictor del potencial de conservación frigorífica (Crisosto, 2002). La fruta que alcanza los 27 a 36 Newtons (N) se considera "*lista para comprar*" y la fruta que alcanza una firmeza de 9 a 13 N se considera madura y "*lista para comer*" (Crisosto, 2002). Crisosto (2004) desarrolló un protocolo de aplicación del tratamiento de acondicionamiento térmico a 20°C para los distribuidores con el que pretendía que las variedades de melocotón y nectarina tratadas llegaran a los centros de distribución con una firmeza no inferior a 27-36N, para disminuir los daños mecánicos de manipulación y transporte, pero tampoco superior, intentando proporcionar así a los consumidores frutos con mejor sabor y textura más adecuada. Además, para cultivares sensibles al daño por frío, tras el acondicionamiento térmico a 20°C la fruta se debía refrigerar a 0°C (nunca a más de 2°C) para evitar la harinosidad y el pardeamiento de la pulpa, e incrementar así la vida de mercado o vida útil en cultivares susceptibles (Crisosto, 2004). Esta técnica de acondicionamiento térmico a 20°C también puede ser usada para premadurar variedades, que aunque no sean sensibles al desarrollo del daño por frío, hayan sido cosechadas en estados inmaduros (Lurie & Crisosto, 2005). Con esta premaduración se puede ofrecer al consumidor frutos con mejor sabor y una textura más adecuada. Los cambios físicos y químicos que se producen en los melocotones sometidos a acondicionamiento térmico a 20°C, permiten mejorar la calidad de la fruta y consecuentemente incrementar el grado de aceptación del consumidor, ya que se evidencia como más jugosa, aromática y sabrosa (Crisosto, 2004).

En la actualidad se perfila un nuevo tipo de consumidor que considera la "fruta de calidad" como aquella que tiene buen aspecto, textura, sabor y alto valor nutricional (Brückner, 2008).

Por tanto, teniendo en cuenta:

- 1) Que el bajo consumo de melocotón en España es debido principalmente a la insuficiente calidad de los frutos en destino.
- 2) Y que la premaduración puede ofrecer al consumidor frutos de mayor calidad.

se plantea el objetivo de este trabajo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es profundizar en los posibles beneficios de la aplicación de un protocolo de premaduración a 20°C, en la frigoconservación de variedades de melocotón de elevado interés comercial en la zona productora de las Vegas Altas del Guadiana (Badajoz), con la finalidad de optimizar su conservación, incrementar su calidad y aceptación de consumo y mejorar por tanto su comercialización.

Para ello se plantean los siguientes objetivos parciales:

Bloque I: Acondicionamiento térmico en las variedades de estudio; caracterización varietal.

- Caracterización postcosecha de los cultivares objeto de estudio y de principal interés en el área de producción.
- Análisis de la aptitud de dichos cultivares a la aplicación de este tratamiento postcosecha. Para lo cual se estudió el efecto residual de la temperatura de conservación frigorífica, el tiempo de conservación frigorífica y la aplicación del protocolo de premaduración, sobre la evolución fisiológica y la vida útil de comercialización.
- Valoración de la aplicación del tratamiento en la disminución de daños por frío sin detrimento de su calidad comercial.

Bloque II: Acondicionamiento térmico y aroma.

- Descripción del perfil de aromas de la variedad más sensible y más resistente al desarrollo de daños por frío, asociado a cada condición de conservación.
- Valoración de la aplicación del tratamiento en la mejora del aroma sin detrimento de su calidad comercial.

Bloque III: Acondicionamiento térmico y expresión proteica.

- Descripción del perfil proteico de la variedad más sensible al daño por frío en cada condición de conservación; estudio proteómico de expresión diferencial.
- Identificación de proteínas asociadas al daño por frío y a la termotolerancia; posibles biomarcadores.



BLOQUE 1:
ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO EN LAS VARIEDADES DE ESTUDIO;
CARACTERIZACIÓN VARIETAL

3. BLOQUE I:

ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO EN LAS VARIEDADES DE ESTUDIO; CARACTERIZACIÓN VARIETAL.

3.1. INTRODUCCIÓN

3.3.1. MADURACIÓN

La maduración de un fruto implica una serie de cambios; se reduce la velocidad de crecimiento, el fruto alcanza su tamaño máximo, disminuye la concentración de inhibidores de la maduración, se agotan los promotores de las semillas maduras, etc. Estos cambios se dan a distintos niveles; físico, bioquímico, metabólico y de expresión génica.

Cambios físicos y bioquímicos

- Cambios de color: los cloroplastos de las células del fruto sufren un desmantelamiento que acaba con la clorofila. En este fenómeno se desenmascaran otros pigmentos existentes con los carotenoides. Además la maduración implica la síntesis *de novo* de otros pigmentos como es el caso de las antocianinas. Todo esto provoca un cambio en el color del fruto que deja de ser verde.
- Cambios del sabor (acidez, astringencia, dulzor): en la respiración celular, tiene lugar una degradación oxidativa de compuestos de reserva que da lugar a compuestos sencillos como azúcares y ácidos orgánicos.
- Cambios del aroma: por catabolismo se generan compuestos que son volátiles y que confieren aroma al fruto.
- Cambios en la textura del fruto: la integridad de las paredes y membranas celulares se pierde durante la maduración. Por acción del etileno se activan una serie de enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces entre los polisacáridos de la pared.

Cambios metabólicos

- Aumento en la respiración.
- Síntesis y liberación de etileno.
- Despolimerización de las paredes celulares
- Metabolismo de almidón y ácidos orgánicos

Cambios en la expresión génica

- El etileno (en frutos climatéricos) induce la expresión de genes específicos de maduración (metabolismo de pared celular y biosíntesis de carotenoides) (Osorio et al., 2012).
- Desaparición de mRNAs y proteínas sintetizadas antes de iniciarse la maduración.
- Aparición de nuevos mRNAs y síntesis *de novo* de enzimas que catalizan cambios específicos de maduración.

3.1.2. CONCEPTO DE CALIDAD

En fisiología postcosecha se considera "madura" a la fase en la que una mercancía ha llegado a una etapa de desarrollo suficiente para que después de la cosecha y manejo postcosecha, su calidad sea al menos la mínima aceptable para el consumidor final. La calidad de la fruta de hueso es una combinación de atributos y propiedades que le dan valor en términos de consumo humano (Crisosto, 1994). Cultivadores y exportadores están preocupados de que sus productos tengan una buena apariencia y pocos defectos visuales. Para receptores y distribuidores, la firmeza y una larga vida de almacenamiento son de gran interés. Para el consumidor calidad es sinónimo de buena apariencia, firmeza, buen sabor y elevado valor nutricional (Bruhn et al., 1991).

3.1.3. ÍNDICES DE CALIDAD

Para conseguir esta calidad se buscan los mejores índices, para cada especie y variedad, que la definan tanto en pre-cosecha como en cosecha. Habitualmente los índices de calidad utilizados para determinar la fecha óptima de recolección en melocotones y nectarinas son: el calibre, el color de la piel, la firmeza de la pulpa, el contenido en sólidos solubles (CSS) y la acidez titulable (AT) (Cano-Salazar, 2012). La forma de calcular estos índices se detalla en material y métodos ([epígrafe 3.2.3](#)).

3.1.3.1. ACIDEZ TITULABLE

La acidez es una medida del contenido en ácidos orgánicos. La fruta de hueso pierde acidez con la maduración debido a la oxidación de los ácidos orgánicos (Crisosto & Crisosto, 2005), aunque esto varía con el cultivar y la estación (Crisosto, 1994).

Iglesias & Echeverría (2009), establecieron una clasificación que permite agrupar cultivares en función de los valores de acidez; sub-ácidas (0-4 g ácido málico/L), dulce- semidulces (4-9 g

ácido málico/L), equilibradas (9-15 g ácido málico/L) y finalmente ácidas (> 15 g ácido málico/L).

La mejora genética de melocotón y nectarina persigue la obtención de variedades con gusto de tipo dulce o sub-ácido (según la variedad y el tipo de consumidor), lo que exige un contenido de azúcares moderado-alto acompañado por un contenido de ácidos bajo. En cambio, no tienen éxito aquellas variedades con frutos cuyo gusto sea excesivamente ácido (Cano-Salazar, 2012).

La acidez del melocotón está controlada por varios factores tales como la variedad, las condiciones climáticas, la posición del fruto en la copa, la carga de cosecha, el estado de madurez y el patrón de donde provengan (Cano-Salazar, 2012).

3.1.3.2. GRADOS BRUX O CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES (CSS)

El contenido en sólidos solubles es una medida de azúcares solubles principalmente. Incrementa con la maduración pero no se recomienda su uso (aislado de otros índices) ya que varía con el cultivar, el área de producción, la estación e incluso la posición en la copa (Crisosto, 1994).

Diversos estudios realizados con melocotón, han asociado una mayor calidad del fruto, y consecuentemente una superior aceptación sensorial por parte del consumidor, con un mayor CSS (Parker, 1991). Es por ello que con el objetivo de incrementar el consumo se recomiendan valores de CSS > 10 °Brix y de firmeza < 49 Newton (N) (Cano-Salazar, 2012).

3.1.3.3. RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES Y LA ACIDEZ TITULABLE (CSS/AT)

Los cambios en el contenido en azúcar y ácidos orgánicos después de la cosecha se deben a una serie de componentes del metabolismo del carbono que operan durante la maduración del fruto (Borsani et al., 2009).

En 1994, Crisosto recopila los estudios que sugieren que la relación CSS/AT ofrece más información acerca de la calidad del fruto que AT o CSS por separado. Una opinión general es que cuánto más alta sea la relación CSS/AT mayor será la aceptación del consumidor. Sin embargo, la misma relación CSS/AT se puede alcanzar con un CSS alto o un CSS bajo pero con una AT más baja. Así, AT baja puede compensar un CSS bajo obteniéndose la misma relación CSS/TA. (Crisosto et al., 2003), sugirieron que la aceptación de consumidor de melocotón era más sensible a la relación CSS/AT que al CSS, pero solamente dentro de una gama aceptable de AT y dependiendo de la variedad.

3.1.3.4. FIRMEZA DE LA PULPA

En la fase final del proceso de maduración del fruto, se produce una pérdida de firmeza, esto es debido a una serie de cambios en la estructura y composición de los polisacáridos que constituyen las paredes celulares (Brummell, 2006; Bustamante et al., 2012), relacionados con la expresión de ciertas hidrolasas y transglucosidasas (Brummell & Harpster, 2001). En concreto las enzimas involucradas en este proceso de reblandecimiento son: exo- y endo-poligalacturonasas (exo-PG, EC 3.2.1.67; endo-PG, EC 3.2.1.15), endo- β -1,4-mananasa (EC 3.2.1.68), α -L-arabinofuranosidasa (ARF, EC 3.2.1.55) and β -galactosidasa (β Gal, EC 3.2.1.23) (Brummell et al., 2004). La hidrólisis de la pared celular está promovida por etileno (Dong et al., 2001).

La firmeza de la pulpa es el indicador básico de calidad en melocotón y nectarina y se considera el mejor indicador del potencial de vida útil ("shelf life") (Crisosto, 2002). En melocotones y nectarinas la firmeza de la pulpa disminuye lentamente desde el comienzo de la maduración para posteriormente sufrir una pérdida de firmeza más rápida (Cano-Salazar, 2012). Melocotones recolectados con una firmeza de 44 a 53N, madurarán después de la cosecha y alcanzarán una mayor calidad que los recolectados con una firmeza de 53 a 67N. Además las variedades tempranas son normalmente menos firmes que las variedades tardías. No se aconseja utilizarlo como índice de forma aislada ya que varía con el cultivar, el tamaño, las condiciones climáticas y las prácticas de cultivo (Crisosto, 1994). Crisosto (2002) clasificó los frutos según su firmeza en frutos "ready to buy", aquellos que alcanzan valores de firmeza entre 26,5 y 35,3 N y frutos "ready to eat" con valores de firmeza entre 8,8 y 13,2 N. Frutos con firmeza por debajo de 27 N son susceptibles a daños durante la manipulación en postcosecha (Crisosto et al., 2001). El final de la maduración está determinado en gran medida por los valores de firmeza y se aconseja transferir tanto melocotones como nectarinas a los puntos de venta antes de que estos hayan alcanzado el punto de firmeza denominado "ready to buy", de esta manera se logrará reducir los potenciales daños físicos que se producen desde los almacenes a las tiendas de venta al por menor y a su vez durante la manipulación en estas últimas (Crisosto, 2002).

3.1.3.5. COLOR

A medida que la fruta madura, los cloroplastos se desmantelan, se destruye la clorofila y se desenmascaran otros pigmentos ya existentes por lo que el fruto cambia su color de verde a amarillo y/o rojo. Además, La luz participa en la transducción de señales que activa la síntesis y acumulación de carotenoides (Alba et al., 2000; Giovannoni, 2004).

Dado que el desarrollo del color rojo de la piel en melocotones y nectarinas depende de la exposición a la luz (y por tanto de su posición en el árbol), serán mejores índices de madurez y calidad el color de fondo de la piel y/o el color de la pulpa (Crisosto, 1994). Según Cano-Salazar (2012) de todos los parámetros utilizados normalmente para medir el color, a^* parece ser el mejor indicador de cambios de color durante la maduración tanto en melocotones como nectarinas, mientras que los parámetros L^* , b^* , hue y el croma cambian sólo ligeramente.

3.1.3.6. RESPIRACIÓN

La respiración es el proceso por el cual los compuestos orgánicos almacenados (carbohidratos, proteínas, grasas) son metabolizados y transformados por hidrólisis en compuestos simples con liberación de energía. En este proceso, se utiliza oxígeno (O_2) y se produce dióxido de carbono (CO_2) (Kader, 2007). En términos generales un tejido vegetal respira más cuanto mayor es su demanda energética. Así, la respiración de los frutos jóvenes durante la fase de crecimiento es alta y disminuye rápidamente antes del proceso de maduración (Azcón-Bieto & Talóm, 2003). En base al patrón de respiración y producción de etileno durante la maduración, las frutas pueden ser climatéricas o no climatéricas. La clasificación en climatérico o no climatérico fue desarrollada bajo la base de presencia o ausencia de incremento respiratorio durante la maduración (Fig 5). La producción de etileno está asociado con el incremento respiratorio en frutos climatéricos, aunque este puede preceder, coincidir o seguir a dicho incremento respiratorio según el fruto (Knee, 2002). Las características organolépticas de los frutos climatéricos se desarrollan durante este periodo de incremento de respiración (Azcón-Bieto & Talóm, 2003).

La energía producida en la respiración en forma de ATP es necesaria para llevar a cabo procesos de síntesis y mantener así la integridad celular después de la recolección (Alique & Zamorano, 2000). La energía liberada en la respiración en forma de calor, conocida como “calor vital”, afecta a las consideraciones tecnológicas postcosecha, como las estimaciones de los requerimientos de refrigeración y ventilación (Kader, 2007).

A medida que los compuestos orgánicos de reservas se agotan el fruto va entrando en senescencia ; el valor nutricional se reduce; la calidad de sabor se pierde (particularmente el dulzor) y hay pérdida de peso seco (Kader, 2007). La velocidad de deterioro (perecibilidad) de la fruta generalmente es proporcional a su velocidad de respiración (Kader, 2007) y por tanto, desde una perspectiva aplicada, se busca mantener la tasa respiratoria a niveles mínimos para mantener la calidad de la fruta (Knee, 2002)

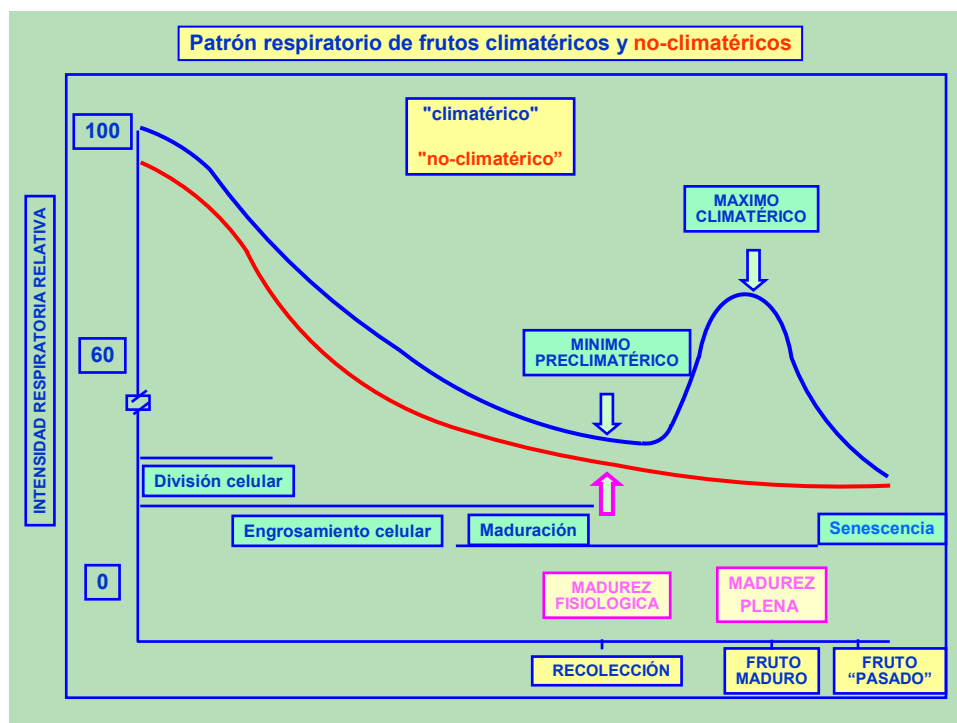


Figura 5. Patrones respiratorios característicos de frutos climatéricos y no climatéricos (Alique & Zamorano, 2000)

3.1.3.7. ETILENO

El etileno (C_2H_4), es el compuesto orgánico más simple que afecta a los procesos fisiológicos de las plantas, es un producto natural del metabolismo y es producido por todos los tejidos de plantas superiores y por algunos microorganismos. Como fitohormona, el etileno regula muchos aspectos del crecimiento, desarrollo y senescencia. Participa en la transducción de señales que activan la maduración (Adams et al. 2004; Giovannoni, 2004). Es fisiológicamente activo en forma gaseosa y en cantidades traza (menos de 0.1 ppm). También juega un papel importante en la abscisión de órganos vegetales. Generalmente, la velocidad de producción de etileno incrementa con el estado de madurez en la cosecha, con los daños físicos, la incidencia de enfermedades y el estrés abiótico. Pero no hay una relación consistente entre la capacidad de producción de etileno de un producto y su perecibilidad. La exposición de los frutos climatéricos al etileno acelera sus procesos metabólicos y su senescencia. Por ello, desde una perspectiva aplicada, se busca reducir la producción de etileno para mantener la calidad. La velocidad de producción de etileno se disminuye con el almacenamiento a baja temperatura y en atmósfera controlada con niveles reducidos de O_2 (menos de 8%) y elevados de CO_2 (más de 2%) alrededor del producto (Kader, 2007).

La maduración del melocotón (como fruto climatérico) está controlada principalmente por la producción de etileno, aunque hay otras hormonas que también participan (Trainotti, Tadiello, & Casadoro, 2007). La auxina (IAA) disminuye justo antes de que comience la maduración (incrementando su forma conjugada IAA-Asp), las giberelinas (GA) también disminuyen (ya que retrasan el desarrollo de coloración roja y el dismantelamiento de la pared celular) y el ácido abscísico (ABA) incrementa promoviendo la acumulación de azúcares en frutos carnosos (Osorio et al., 2013).

3.1.4. REFRIGERACIÓN, DAÑOS POR FRÍO Y COMO PALIARLOS

El control de la temperatura es una de las principales herramientas utilizadas para reducir el deterioro postcosecha de frutas y retrasar su maduración ya que: disminuye las pérdidas por transpiración y por tanto las pérdidas de peso, retrasa y reduce el máximo climatérico, retrasa y disminuye la síntesis de etileno. Además disminuye la hidrólisis de almidón (si existe) y oligosacáridos de reserva, disminuye el consumo de azúcares sencillos en la respiración, disminuye la acumulación de ácidos orgánicos (en especies tropicales y subtropicales), disminuye la pérdida de ácidos orgánicos (en especies continentales) y disminuye la síntesis o degradación de pigmentos, compuestos fenólicos y compuestos volátiles.

Sin embargo, la aparición de los desórdenes fisiológicos conocidos genéricamente con el nombre de daños por frío se debe principalmente al uso de un rango de temperatura que varía entre 2,2 y 7,8 °C durante la conservación frigorífica (Crisosto & Labavitch, 2002). Según (Lurie & Crisosto, 2005a) los daños por frío en melocotones y nectarinas son conocidos también con el nombre genérico de descomposición interna ("internal breakdown").

Se han probado que el "acondicionamiento térmico", "pre-maduración", "retraso en el almacenamiento frigorífico" o "prealmacenamiento" en fruta de hueso es un tratamiento postcosecha que retrasar y limitar el desarrollo de este desorden (Crisosto, 2004).

Hasta la fecha se han llevado a cabo numerosos estudios postcosecha en melocotón, abordando su maduración y su posible retraso, su calidad, su respuesta a estrés etc... Se han realizado estudios previos sobre acondicionamiento térmico en fruta de hueso pero no en las mismas variedades de estudio de este ensayo. Es por ello que se abordarán los siguientes objetivos en el Bloque I

- Caracterización postcosecha de los cultivares objeto de estudio y de principal interés en el área de producción.
- Análisis de la aptitud de dichos cultivares a la aplicación de este tratamiento postcosecha. Para lo cual se estudió el efecto residual de la temperatura de conservación frigorífica, el tiempo de conservación frigorífica y la aplicación del protocolo de premaduración, sobre la evolución fisiológica y la vida útil de comercialización.
- Valoración de la aplicación del tratamiento en la disminución de daños por frío sin detrimento de su calidad comercial.

El plan de trabajo para este bloque se basa en dos estudios llevados a cabo con parte del material recolectado en la primera campaña frutícola (variedades en negrita)

campana 1 (2007)	Ensayo 1 13/junio	Ensayo 2 23/julio	Ensayo 3 5/septiembre
MELOCOTÓN	Ruby Rich	Elegant Lady	Alejandro Dumas
	Royal Glory	Sum 67	
campana 2 (2008)	Ensayo 1 16/junio	Ensayo 2 15/julio	Ensayo 3 29/agosto
MELOCOTÓN	Royal Glory	Elegant Lady	Alejandro Dumas

Estudio 1. Caracterización de las variedades tras la recolección.

Estudio 2. Caracterización varietal durante la conservación.

- A. Efecto del tiempo y la temperatura de conservación frigorífica.**
- B. Efecto del tratamiento postcosecha (acondicionamiento térmico).**

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

La fruta, procedente de un mismo productor, fue recolectada con una firmeza superior a 45N e inferior a 67N y una vez procesada en la central hortofrutícola (selección por calibre y ausencia de daños y envasado en cajas comerciales con alveolos) se llevó a cabo la recogida de muestra, de esta forma se aseguraba la homogeneidad de la misma (tanto en tamaño como en color). Seguidamente se llevó a cabo un análisis inicial en la misma central e inmediatamente se trasladó la muestra a las instalaciones del ICTAN (CSIC, Madrid). Una vez allí la muestra se distribuyó en cámaras frigoríficas con control de temperatura y humedad relativa de la siguiente manera. Se constituyeron cuatro lotes. Un lote a 0°C (como temperatura óptima de conservación), otro lote a 5°C (como temperatura deficiente de conservación; daño por frío); ambos serán los controles ("C" en adelante). Los dos lotes restantes se mantuvieron a 20°C hasta que su firmeza disminuyó a 40-45N y entonces uno de los lotes se transfirió a 0°C y el otro a 5°C; ambos lotes serán los tratados, frutos a los que se le aplica el protocolo de premaduración ("DS" en adelante) (Fig 6).

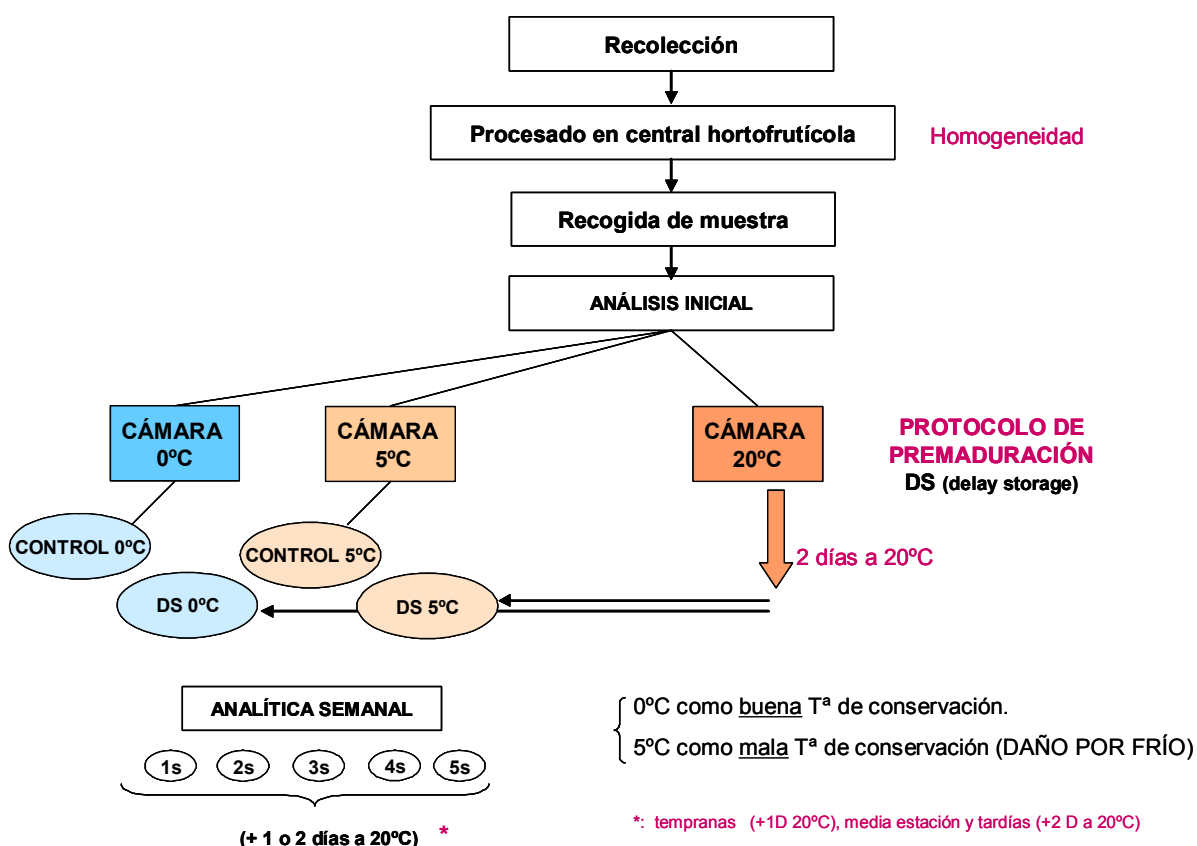


Figura 6: Diagrama de manejo del material vegetal

3.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

La fruta se analizó semanalmente hasta un máximo de cinco semanas. Las analíticas se realizaron tras un día a 20°C en las variedades tempranas y tras dos días a 20°C en las variedades de media estación y tardías, de esta manera aseguramos la detección de los posibles daños por frío.

VARIEDAD	TIEMPOS DE ANÁLISIS (semanas)					
Ruby rich	INICIAL	1s+1D20°	2s+1D20°	3s+1D20°	4s+1D20°	5s+1D20°
Royal glory	INICIAL	1s+1D20°	2s+1D20°	3s+1D20°	4s+1D20°	5s+1D20°
Elegant lady	INICIAL=1D 20°	1s+2D20°	2s+2D20°	3s+2D20°	4s+2D20°	X
Sum67	INIICIAL	1s+2D20°	2s+2D20°	3s+2D20°	4s+2D20°	5s+2D20°
Alejandro Dumas	INICIAL	X	2s+2D20°	3s+2D20°	4s+2D20°	5s+2D20°

(Siendo INICIAL: t=0 , momento de cosecha, s: semana, D: día)

3.2.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

En cada analítica semanal se evaluaron parámetros fisiológicos (respiración y producción de etileno), parámetros de calidad (color de piel y pulpa, textura, acidez, composición en sólidos solubles), jugosidad e identificación y cuantificación de daños (externos e internos).

3.2.3.1. RESPIRACIÓN Y PRODUCCIÓN DE ETILENO

Para determinar la producción de CO₂ y C₂H₄ se utilizó un cromatógrafo de gases portátil; Varian Chrompack mod. CP 2003P con Helio como gas portador, columna Poraplot Q y una presión de cabeza de columna de 180 kPa (equivalente a un caudal de 0.2 a 0.4 ml/min por extracción automática de muestra gaseosa). Se empleó para ello 3 frascos de vidrio con cierre hermético de 1700 ml de volumen por lote (n=3). Cada uno contenía durante 1h 30 min 2 frutos (en el caso de melocotón y nectarina) y 3 frutos (en el caso de ciruelas) y se analizaba la atmósfera generada. Se determinó la **respiración** en **ml CO₂/kg*h** y la **producción de etileno** en **µl C₂H₄/kg*h**.

3.2.3.2. FIRMEZA

Para determinar la firmeza se utilizó un texturómetro; Instron Food Testing Instrument modelo 4501 con apoyo informático, mediante ensayo de penetración con punzón de 8mm. Con una célula de carga de 100N y una velocidad de desplazamiento de la célula de 300

mm.min-1. El tamaño muestral fue de 18 frutos por lote. Se determinó la **fuerza máxima a rotura en N**.

3.2.3.3. COLOR

CIE $L^*a^*b^*$ (CIELAB) es el modelo cromático usado normalmente para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano. Fue desarrollado específicamente con este propósito por la Comisión Internacional de la Iluminación (Commission Internationale d'Eclairage), razón por la cual se abrevia CIE. Los asteriscos (*) que siguen a cada letra forman parte del nombre, ya que representan L^* , a^* y b^* , de L , a y b .

Los tres parámetros en el modelo representan la luminosidad de color (L^* , $L^*=0$ rendimientos negro y $L^*=100$ indica blanca), su posición entre rojo y verde (a^* , valores negativos indican verde mientras valores positivos indican rojo) y su posición entre amarillo y azul (b^* , valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo) (Fig. 7).

Para la determinación del color se utilizó un colorímetro portátil, KONIKA-MINOLTA modelo CM 2600 d y software de apoyo Spectramagic . Se determinaron los parámetros CIE/CIELAB: L^* (luminosidad), $+a^*$ (intensidad del rojo) y $+b^*$ (intensidad del amarillo) en piel (zona madura y zona verde o "color de fondo" en frutos con maduración diferencial) y en pulpa. El área de medida (tamaño de la máscara) fue de 8mm de diámetro. Transformamos los parámetros convencionales en una serie índices más eficaces para discriminar cambios de color en postcosecha. Estos son el índice "**croma**" (definido por la función $\sqrt{a^2+b^2}$) que representa el grado de saturación del color rojo y el índice "**hue**" (definido por la función $\arctang(b/a)$ en frutos que viran de amarillo a rojo, que representa el nivel del color amarillo. El tamaño muestral fue de 18 frutos por lote.

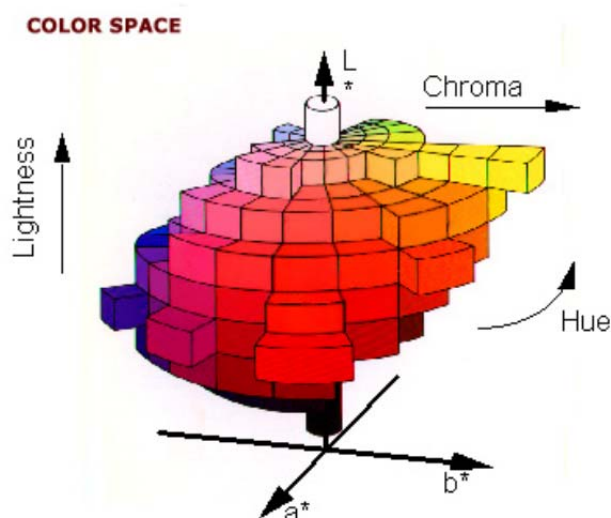


Figura 7. Relación de los parámetros Cielab* ($+a^*$, $+b^*$) y luminosidad (L^*), con los índices de color: saturación (*croma*) y tonalidad (*hue*)

3.2.3.4. ACIDEZ

Para determinar la acidez se utilizó un titulador automático; METTLER mod DL70. La valoración se hizo con NaOH 0.1N hasta pH 8.1. Para lo cual se elaboraban homogeneizados procedentes de 6 frutos cada uno. El tamaño muestral fue de 3 homogeneizados por lote. Los resultados se expresaron en **mg de ac.málico/g de peso fresco**.

3.2.3.5. CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES (CSS)

Para la determinación del contenido en sólidos solubles (azúcares solubles mayoritariamente) se utilizó un refractómetro digital Atago dbx 30 con control automático de temperatura. Se determina así el contenido en sólidos solubles a través del índice de refracción de la muestra (jugo de cada fruto y paralelamente homogeneizado utilizados para la determinación de la acidez titulable). El tamaño muestral fue de 18 frutos por lote. Los resultados se expresaron en **porcentaje de sólidos solubles totales**.

3.2.3.6. JUGOSIDAD

El tamaño muestras fue de 3 homogeneizados por lote (los mismos utilizados para la determinación de la acidez titulable). Para determinar el porcentaje de zumo extraído se utilizó el protocolo de (Crisosto & Labavitch, 2002) con algunas modificaciones; pesamos 25g de cada homogeneizado, centrifugamos en tubos de 50 ml a 6000 g, 20 min y 20°C y medimos el peso y el volumen del sobrenadante. Los resultados se expresaron en **% de zumo extraído**.

3.2.3.7. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DAÑOS (EXTERNOS E INTERNOS)

El tamaño muestral fue de 18 frutos por lote. Los resultados se expresaron en **% frutos afectados**. Y se establecieron unos límites de tolerancia del 10% para hongos y del 25% para cualquier otro tipo de daño a partir de los cuales se definió la vida útil para cada variedad y condición ensayada.

3.2. 4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se evaluó, para cada variedad, el efecto de la temperatura de conservación y del tratamiento sobre cada variable de estudio, mediante análisis de varianza ANOVA y comparación de medias mediante el test LSD (Least Significant Difference, $p \leq 0.05$) en tiempos constantes (semanas de conservación), mediante programa estadístico SPSS.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. ESTUDIO 1: CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIEDADES TRAS LA RECOLECCIÓN

Se seleccionaron conjuntamente con la Asociación de Fruticultores de Extremadura (AFRUEX) variedades de melocotón de referencia y de interés, intentando que la selección fuera representativa de las diferentes etapas de recolección. Así, se seleccionaron las variedades “Ruby Rich” y “Royal Glory” como variedades tempranas, cosechadas entre 90 y 120 días después de plena floración (ddpf), las variedades “Elegant Lady” y “Sum 67” como variedades de media estación, cosechadas entre 121 y 150 ddpf y la variedad “Alejandro Dumas” como variedad tardía y cosechada tras 150 ddpf.

TAMAÑO, FORMA Y COLORACIÓN DE LOS FRUTOS

(Los datos a los que se hace referencia en este apartado se recogen en la [Tabla1 \(ANEXO 1; PDF\)](#))

La forma de los frutos en “Ruby Rich”, “Royal Glory” y “Alejandro Dumas” es globosa mientras que en “Elegant Lady” y “Sum 67” es ligeramente achatada. El tamaño medio de los frutos de las diferentes variedades estudiadas fue mayor cuanto más tardía fue la recolección. Así, mientras las variedades tempranas “Ruby Rich” y “Royal Glory” no alcanzaban los 150 g de peso, la variedad tardía “Alejandro Dumas” superó los 250 g, presentando las variedades de media estación valores intermedios. Se trata de cinco variedades de melocotón rojo y de pulpa amarilla ([Fig. 9](#)). “Ruby Rich” y “Sum 67” presentaron una coloración de la piel más roja y homogénea que el resto de variedades. Esta diferencia visual fue apreciada por los parámetros de color de fondo de la piel, con bajos valores de tonalidad (*hue*) y altos valores del parámetro “a”. Las variedades con una coloración de la piel más amarilla fueron “Alejandro Dumas” y “Elegant Lady” con altos valores de tonalidad (*hue*) y muy bajos valores del parámetro “a” indicador del color rojo. En cuanto al color de la pulpa, observamos un desarrollo diferente de la coloración en función de la época de recolección. Así, los valores inferiores del parámetro “a” se obtienen en las variedades de recolección temprana “Ruby Rich” y “Royal Glory”, observándose mayores valores de este parámetro en la coloración de la pulpa de las variedades de media estación y tardía. El desarrollo de color amarillo intenso en las variedades de recolección de media estación y tardía también fue registrado cuando comparamos los valores de la tonalidad (*hue*).

ÁCIDEZ, CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES Y FIRMEZA DE LOS FRUTOS

(Los datos a los que se hace referencia en este apartado se recogen en la [Tabla1 \(ANEXO 1; PDF\)](#))

La acidez titulable de las diferentes variedades estudiadas fue muy variable, no encontrando una relación de la misma y la época de recolección. Así, en las variedades tempranas, mientras "Ruby Rich" fue el cultivar más ácido de todos tras la recolección, "Royal Glory" presentaba una baja acidez. La menor acidez la encontramos en la variedad "Sum 67", presentando "Elegant Lady" y "Alejandro Dumas" valores de acidez intermedia.

Utilizando la clasificación elaborada por Iglesias & Echeverría (2009) en función a la concentración de ácido málico (g/L), se puede considerar a las variedades objeto de estudio como:

- subácidas/muy dulces (A.T. < 3,3 g/L de ácido málico): "Sum 67"
- dulces/ semidulces (A.T. entre 3,3 y 6 g/L de ácido málico): "Royal Glory"
- equilibradas (A.T. entre 6 y 8 g/L de ácido málico): "Alejandro Dumas"
- ácidas (A.T. entre 8 y 10 g/L de ácido málico): "Elegant Lady"
- muy ácidas (A.T. > 10 g/L de ácido málico): "Ruby Rich"

No se encuentran grandes diferencias entre variedades en cuanto a su CSS a excepción de "Royal Glory" con valores inferiores a 9ºBrix en zumo y pulpa. El resto de variedades mostraron valores entre 10,8 y 12,3ºBrix, siendo "Sum 67" la variedad con mayor CSS. (Crisosto et al., 2003) sugieren que la aceptación del consumidor de melocotón está más relacionada con el índice de calidad conformado entre el contenido en sólidos solubles y la acidez titulable (CSS/AT) que con cada uno de los índices de calidad por separado, siendo mayor la aceptación del consumidor cuanto mayor sea el valor entre CSS/AT. No obstante, y dentro de unos rangos razonables de acidez, un mismo valor de CSS/AT puede ser alcanzado con un alto CSS y alta acidez o con un CSS bajo acompañado de una baja AT, siendo preferencia del consumidor los frutos con un mayor CSS. "Sum 67" además de ser el cultivar con mayor CSS fue el cultivar con mayor valor del índice CSS/AT, al presentar valores muy bajos de acidez. La variedad "Royal Glory", con los menores CSS de todas las variedades objeto de estudio, alcanzaba índices muy aceptables de CSS/AT debido al bajo nivel de acidez de los frutos. Por el contrario, "Ruby Rich", con CSS de 10,8ºBrix, fue la que obtuvo los menores valores del índice de calidad CSS/AT al no poder compensar la alta acidez de sus frutos.

Todas las variedades fueron recolectadas con una firmeza superior a los 44 N e inferior a 67N. "Elegant Lady" fue la variedad que se recolectó con una firmeza superior, "Royal Glory" y "Sum 67" presentaban una firmeza intermedia entre 50 y 60 N, mientras que "Ruby Rich" y "Alejandro Dumas" presentaron valores medios de firmeza inferiores a los 50 N. La variabilidad

de la firmeza en cada uno de los cultivares fue baja y similar en cada una de las variedades a excepción del cultivar "Alejandro Dumas" que presentaba una alta variabilidad en este parámetro.

INTENSIDAD RESPIRATORIA Y PRODUCCIÓN DE ETILENO

(Los datos a los que se hace referencia en este apartado se recogen en la [Tabla1 \(ANEXO 1; PDF\)](#))

La intensidad respiratoria (IR) a 20°C de las variedades analizadas conforma dos grupos diferenciados: variedades tempranas y tardía con IR superiores a los 20 ml de CO₂/kg·h ("Rubi Rich", "Royal Glory" y "Alejandro Dumas") y variedades de media estación con IR inferiores a los 10 ml de CO₂/kg·h ("Elegant Lady" y "Sum 67"). No se encuentra por tanto una relación entre la IR y la época de recolección. Sí se observa sin embargo que estas variedades de media estación con menores IR presentan los mayores valores de firmeza pudiendo ser indicativo de un menor desarrollo de la maduración de los frutos.

Tras la recolección de las diferentes variedades no se detecta producción de etileno en las mismas.

		Ruby rich		Royal glory		Elegant lady		Sun 67		Alejandro Dumas		
		n	promedio	dev. Est	promedio	dev. Est	promedio	dev. Est	promedio	dev. Est	promedio	dev. Est
PESO	(g)	18	133.21	11.12	146.08	15.85	169.86	9.06	231.51	36.02	250.29	9.20
CALIBRE	diámetro ecuatorial menor (mm)	18	62.55	2.11	64.21	2.63	68.47	1.54	75.32	2.13	76.95	2.38
	diámetro ecuatorial mayor (mm)	18	66.46	3.13	66.35	2.78	70.15	1.37	79.58	1.81	78.99	2.38
ACIDEZ TITULABLE m=3	altura (mm)	18	60.49	3.16	66.74	2.85	63.34	2.17	65.57	3.92	80.50	2.81
	AT (mg ac. Málico/g peso fresco)	3	11.6	0.71	4.16	0.30	7.51	1.90	2.70	0.18	6.65	0.42
CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES en zumo n=18	CSS (%)	18	10.8	0.82	8.90	0.10	10.64	1.04	12.33	1.06	11.06	1.12
CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES en pulpa n=3	CSS (%)	3	10.83	0.38	8.90	0.10	11.13	0.62	11.13	0.76	11.23	0.35
	CSS/AT		0.93	0.03	2.14	0.17	1.42	0.13	4.57	0.55	1.66	0.08
FIRMEZA	Fmax (N)		46.35	6.16	53.35	4.93	63.87	6.83	56.79	5.84	44.45	14.34
COLOR Piel (color de fondo)	a*	18	19.76	9.06	20.23	8.57	8.84	4.25	26.78	6.71	5.83	5.06
	b*	18	35.51	13.62	29.32	8.29	48.87	2.70	28.53	6.27	45.12	3.05
	L	18	53.42	6.42	54.71	2.14	73.67	2.91	51.73	1.73	69.49	2.17
	chroma (saturación)	18	42.08	2.80	37.32	0.77	44.88	0.47	40.10	0.42	45.77	0.76
	hue (tono)	18	0.86	0.15	0.95	0.07	1.37	0.03	0.81	0.05	1.18	0.25
COLOR pulpa	a*	18	5.04	3.65	3.33	2.93	5.24	1.81	6.51	0.69	6.51	0.55
	b*	18	34.16	10.50	47.80	2.72	48.87	4.58	48.09	3.37	43.65	0.83
	L	18	73.64	0.44	77.04	0.40	73.67	9.06	75.62	2.89	80.14	0.43
	chroma (saturación)	18	35.35	4.56	48.00	0.64	45.17	1.09	48.60	0.82	44.16	0.88
	hue (tono)	18	1.16	0.18	1.33	0.17	1.46	0.01	1.44	0.01	1.42	0.01
RESPIRACIÓN	ml de CO2/kg.h	3	21.69	1.24	25.96	2.52	7.44	0.59	5.15	0.09	24.99	0.78
ETILENO	µl etileno/kg.h	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla 1 (ANEXO 1; PDF). Índices de calidad de las cinco variedades de estudio, en el momento de su recolección. Media y desviación estándar.



Ruby Rich



Royal Glory



Elegant Lady



Sum 67



Alejandro Dumas

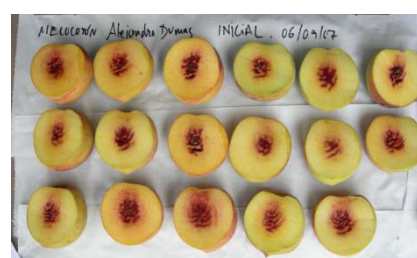


Figura 9. Imágenes externas e internas de las distintas variedades de estudio en el momento de la recolección (INICIAL)

3.3.2. ESTUDIO 2: CARACTERIZACIÓN VARIETAL DURANTE LA CONSERVACIÓN

Para caracterizar las distintas variedades durante la conservación, se han determinado distintos parámetros estándar de calidad en las variedades de estudio (Tablas 2, 3, 4, 5 y 6) incluyendo medidas de acidez, CSS, emisión de etileno, firmeza y descripción cromática de piel y pulpa.

Ruby Rich			s0	s1	s2	s3	s4	s5				
mg ac. málico/g peso fresco	INI	11,6										
	C 0		10,9	b	9,6	a	9,3	ab	9,7	b	9,7	c
	DS 0		10,6	ab	10,5	b	10,0	b	9,6	b	9,8	c
	C 5		10,5	ab	9,8	ab	9,0	a	8,0	a	8,8	b
	DS 5		9,8	a	9,9	ab	10,1	b	8,3	a	7,5	a
CSS zumo (%)	INI	10,8										
	C 0		10,0	a	10,8	ab	10,4	a	10,3	a	11,6	b
	DS 0		10,1	a	11,2	b	11,0	ab	11,0	ab	10,7	a
	C 5		9,6	a	10,8	ab	10,9	ab	11,1	b	10,5	a
	DS 5		9,6	a	10,4	a	11,1	b	11,0	ab	10,8	a
CSS pulpa/AT	INI	1,1										
	C0		1,0	a	0,9	ab	0,9	b	0,9	b	0,817	bc
	DS0		1,1	a	1,0	b	1,0	b	0,9	b	0,9	c
	C5		1,1	a	0,9	a	0,8	a	0,7	a	0,7	b
	DS5		1,0	a	1,0	ab	0,9	b	0,8	a	0,4	a
ul C2H4/kg*h	INI	0,0										
	C 0		0,0	a	0,0	a	0,0	ab	0,0	a	0,0	a
	DS 0		0,0	a	0,0	a	0,0	a	1,9	a	0,0	a
	C 5		0,0	a	5,3	a	15,6	bc	56,6	c	106,6	c
	DS 5		0,0	a	9,8	a	25,5	c	41,7	b	83,7	b
Fmax (N)	INI	46,3										
	C 0		48,2	b	45,8	b	39,6	b	42,1	c	41,4	b
	DS 0		43,1	ab	37,1	a	35,8	b	35,4	b	36,5	b
	C 5		41,4	a	32,3	a	25,1	a	14,7	a	11,4	a
	DS 5		40,2	a	33,1	a	20,0	a	11,0	a	14,3	a

Tabla 2a

Tabla 2a y 2b (ANEXO 2-1; PDF). Parámetros estándar de calidad en melocotón “Ruby Rich”, tras frigoconservación, con y sin retraso en el almacenamiento frigorífico. Medidas semanales más un día a 20°C. C: lotes control; DS: lotes tratados (protocolo de premaduración); INI: inicial o momento de cosecha. Medias semanales seguidas de distinta letra son significativamente distintas ($p \leq 0.05$; test LSD)

Tabla 3 (ANEXO 2-2; PDF). Parámetros estándar de calidad en melocotón “Royal Glory”, tras frigoconservación, con y sin retraso en el almacenamiento frigorífico. Medidas semanales más un día a 20°C. C: lotes control; DS: lotes tratados (protocolo de premaduración); INI: inicial o momento de cosecha. Medias semanales seguidas de distinta letra son significativamente distintas ($p \leq 0.05$; test LSD)

Royal Glory		s0	s1	s2	s3	s4	s5
mg ac. málico/g peso fresco	INI	4,2					
	C 0		3,7 ab	3,3 a	3,6 ab	3,4 b	2,7 a
	DS 0		4,1 b	3,9 a	3,7 b	3,0 ab	2,8 a
	C 5		3,4 a	3,5 a	3,0 a	2,6 a	2,6 a
	DS 5		4,2 b	3,8 a	2,9 a	3,1 ab	2,8 a
CSS zumo (%)	INI	8,9					
	C 0		10,1 b	10,2 c	10,8 bc	9,3 a	9,8 a
	DS 0		10,0 b	9,75 bc	11,0 c	10,5 b	11,5 b
	C 5		10,1 b	8,9 a	9,9 a	9,6 a	9,5 a
	DS 5		9,2 a	9,1 ab	10,1 ab	10,1 ab	9,0 a
CSS pulpa/AT	INI	2,1					
	C 0		2,5 a	2,9 a	3,0 a	2,9 a	3,6 a
	DS 0		2,2 a	2,4 a	2,8 a	3,6 ab	3,9 a
	C 5		3,8 b	2,7 a	3,4 a	4,0 b	3,5 a
	DS 5		2,3 a	2,5 a	3,3 a	3,3 ab	3,0 a
ul C2H4/kg·h	INI	0,0					
	C 0		0,0 a	0,0 a	2,7 a	0,0 a	0,0 a
	DS 0		0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	4,4 a
	C 5		5,1 a	3,6 a	20,6 b	87,1 b	31,5 b
	DS 5		0,0 a	6,0 a	29,7 b	93,5 b	90,6 b
Fmax (N)	INI	53,4					
	C 0		51,2 b	55,6 c	43,5 b	52,1 c	55,3 c
	DS 0		37,3 a	36,0 b	35,3 b	35,4 b	29,5 b
	C 5		48,2 b	34,1 b	11,2 a	9,1 a	6,4 a
	DS 5		44,8 ab	19,6 a	12,0 a	6,3 a	6,7 a
COLOR DE FONDO (PIEL)	croma	INI	37,3				
		C 0		38,3 b	39,5 a	40,6 a	40,3 a
		DS 0		36,9 ab	40,6 a	41,1 ab	40,4 a
		C 5		36,1 a	40,0 a	42,7 ab	44,6 b
		DS 5		40,7 c	40,9 a	43,6 c	46,2 b
	hue	INI	1,0				
		C 0		0,97 bc	1,1 a	1,0 a	0,9 a
		DS 0		0,9 b	1,0 a	1,1 a	0,9 a
		C 5		0,7 a	1,1 a	1,0 a	0,9 a
		DS 5		1,1 c	1,0 a	1,0 a	0,9 a
	L	INI	54,7				
		C 0		55,9 bc	61,1 a	59,9 a	60,2 a
		DS 0		53,3 b	60,1 a	61,9 a	54,8 a
		C 5		46,8 a	62,7 a	60,8 a	59,4 a
		DS 5		59,0 c	61,2 a	61,6 a	61,1 a
	a*	INI	20,2				
		C 0		20,9 a	16,9 a	19,3 a	20,3 a
		DS 0		22,7 a	20,0 a	18,3 a	23,5 ab
		C 5		27,6 b	17,6 a	23,4 a	27,8 b
		DS 5		19,7 a	20,2 a	23,6 a	27,0 b
	b*	INI	29,3				
		C 0		30,6 bc	34,0 a	34,2 a	34,0 a
		DS 0		28,3 b	34,3 a	35,7 a	31,7 a
		C 5		22,6 a	35,2 a	34,7 a	34,0 a
		DS 5		34,5 c	34,5 a	35,7 a	36,9 a
COLOR PULPA	croma	INI	48,0				
		C 0		46,7 b	43,0 a	41,6 a	41,9 a
		DS 0		43,9 a	45,7 b	42,6 a	43,5 ab
		C 5		46,9 b	43,4 a	47,3 b	45,6 b
		DS 5		48,1 b	43,7 ab	46,4 b	48,3 c
	hue	INI	1,3				
		C 0		1,3 a	1,5 a	1,4 a	1,4 a
		DS 0		1,4 a	1,4 a	1,4 a	1,4 a
		C 5		1,4 a	1,5 a	1,4 a	1,4 a
		DS 5		1,5 a	1,4 a	1,4 a	1,4 a
	L	INI	77,0				
		C 0		75,4 ab	76,8 b	77,3 b	76,5 ab
		DS 0		74,6 ab	74,5 a	77,5 b	78,3 b
		C 5		74,0 a	78,0 b	74,3 a	74,7 a
		DS 5		76,1 b	77,8 b	75,7 ab	74,4 a
	a*	INI	3,3				
		C 0		4,6 a	4,5 a	5,0 a	7,0 a
		DS 0		7,1 b	7,1 b	5,9 ab	6,2 a
		C 5		7,5 b	4,5 a	8,8 c	9,7 b
		DS 5		5,1 a	5,4 ab	7,8 bc	10,2 b
	b*	INI	47,8				
		C 0		46,3 b	42,7 a	41,3 a	41,3 a
		DS 0		43,0 a	45,1 b	42,1 a	43,1 ab
		C 5		46,1 b	43,1 ab	46,4 b	44,5 b
		DS 5		47,8 b	43,4 ab	45,7 b	47,2 c

Tabla 3

Elegant Lady		s0	s1	s2	s3	s4		
mg ac. málico/g peso fresco	INI	7,5						
	C 0		6,8	b	5,4	b	5,3	b
	DS 0		5,8	a	5,3	b	4,6	ab
	C 5		5,1	a	4,4	a	4,3	a
	DS 5		5,5	a	4,9	ab	4,5	a
CSS zumo (%)	INI	10,6						
	C 0		10,3	ab	10,6	b	10,4	a
	DS 0		10,6	b	10,5	ab	9,8	a
	C 5		9,6	a	9,8	a	9,9	a
	DS 5		9,9	ab	9,8	a	10,6	a
CSS pulpa/AT	INI	1,5						
	C 0		1,7	a	2,2	a	2,2	a
	DS 0		2,1	ab	2,2	a	2,4	a
	C 5		2,1	b	2,6	a	2,5	a
	DS 5		1,9	ab	2,3	a	2,5	a
ul C2H4/kg*h	INI	0,0						
	C 0		4,4	a	4,9	a	5,2	a
	DS 0		20,4	ab	29,5	a	22,6	a
	C 5		17,9	ab	79,9	b	105,8	b
	DS 5		29,2	b	69,7	b	104,3	b
Fmax (N)	INI	63,9						
	C 0		14,1	b	20,9	b	54,3	b
	DS 0		6,5	a	5,1	a	7,2	a
	C 5		7,3	a	5,3	a	6,0	a
	DS 5		5,8	a	4,5	a	4,7	a
jugosidad (% zumo extraíble)	INI							
	C 0				36,7	a	59,4	b
	DS 0				54,9	b	59,3	b
	C 5				52,6	b	54,7	a
	DS 5				59,8	c	59,1	b
COLOR DE FONDO (PIEL)	croma	INI	44,9					
		C 0		49,4	a	49,2	a	48,7
		DS 0		48,1	a	51,7	bc	52,235
		C 5		49,7	a	50,2	ab	50,7
		DS 5		52,4	b	52,9	c	53,4
	hue	INI	1,4					
		C 0		1,3	b	1,1	a	1,1
		DS 0		1,0	a	1,1	a	1,2
		C 5		1,2	b	1,1	a	1,2
		DS 5		1,2	b	1,1	a	1,1
	L	INI	69,67					
		C 0		71,10	b	67,87	a	66,06
		DS 0		59,65	a	69,34	a	69,77
		C 5		67,59	b	67,07	a	70,23
		DS 5		67,86	b	64,29	a	65,61
	a*	INI	8,85					
		C 0		14,09	a	20,26	a	23,06
		DS 0		25,60	c	24,11	ab	20,34
		C 5		18,85	b	22,76	ab	18,15
		DS 5		20,30	b	25,9	bc	23,49
	b*	INI	43,77					
		C 0		47,01	b	43,68	a	41,44
		DS 0		39,09	a	44,90	a	47,38
		C 5		45,09	b	43,86	a	46,59
		DS 5		47,40	b	45,53	a	47,24
COLOR PULPA	croma	INI	49,2					
		C 0		50,7	a	48,4	a	44,1
		DS 0		54,4	b	51,9	b	47,8
		C 5		53,7	b	52,9	b	48,4
		DS 5		53,7	b	56,1	c	48,8
	hue	INI	1,46					
		C 0		1,39	c	1,36	c	1,34
		DS 0		1,32	a	1,30	a	1,34
		C 5		1,35	b	1,33	b	1,36
		DS 5		1,34	ab	1,30	a	1,32
	L	INI	73,7					
		C 0		76,7	a	78,2	c	77,6
		DS 0		74,9	a	75,3	ab	74,6
		C 5		76,1	a	76,9	bc	78,4
		DS 5		75,9	a	73,3	a	76,0
	a*	INI	5,2					
		C 0		9,4	a	10,1	a	10,2
		DS 0		13,6	c	13,6	bc	11,0
		C 5		11,9	b	12,5	b	10,4
		DS 5		12,4	bc	14,8	c	12,2
	b*	INI	48,9					
		C 0		49,8	a	47,3	a	42,9
		DS 0		52,7	b	49,9	b	46,4
		C 5		52,3	b	51,4	b	47,3
		DS 5		52,2	ab	54,1	c	47,3

Tabla 4

Tabla 4 y 5 (ANEXO 2-3, 2-4; PDF). Parámetros estándar de calidad en melocotón “Elegant Lady” y “Sum 67”, tras frigoconservación, con y sin retraso en el almacenamiento frigorífico. Medidas semanales más dos días a 20°C.C: lotes control; DS: lotes tratados; INI: inicial o momento de cosecha. Medias semanales seguidas de distinta letra son significativamente distintas ($p \leq 0.05$; test LSD)

Sum 67		s0	s1	s2	s3	s4	s5
mg ac. málico/g peso fresco	INI	2,7					
	C 0	2,5	b	2,0	a	1,5	a
	DS 0	3,1	c	2,7	c	1,9	b
	C 5	2,2	a	1,8	a	1,5	a
	DS 5	2,8	b	2,5	b	1,6	ab
CSS zumo (%)	INI	12,3					
	C 0	11,8	a	12,3	a	11,6	a
	DS 0	11,9	a	12,3	a	11,7	a
	C 5	11,5	a	12,3	a	11,7	a
	DS 5	11,9	a	12,2	a	11,8	a
CSS pulpa/AT	INI	4,2					
	C 0	4,9	a	6,4	ab	8,2	a
	DS 0	4,1	a	4,9	a	6,9	a
	C 5	5,5	a	7,5	b	8,0	a
	DS 5	4,5	a	5,1	a	7,9	a
ul C2H4/kg·h	INI	0,0					
	C 0	2,3	a	1,3	a	6,7	a
	DS 0	12,9	ab	12,9	ab	27,6	b
	C 5	9,3	a	20,5	ab	30,8	b
	DS 5	29,5	b	27,6	b	63,4	c
F _{max} (N)	INI	56,8					
	C 0	12,5	b	18,5	b	36,4	c
	DS 0	7,5	ab	6,6	a	6,2	a
	C 5	9,3	ab	17,7	b	16,9	b
	DS 5	5,3	a	5,2	a	5,5	a
COLOR DE FONDO (PIEL)		croma	INI	40,1			
			C 0	40,6	a	41,1	a
			DS 0	43,7	b	42,6	ab
			C 5	42,5	ab	43,5	b
			DS 5	42,4	ab	44,6	b
		hue	INI	0,8			
			C 0	0,8	a	0,9	a
			DS 0	0,8	a	0,8	a
			C 5	0,8	a	0,9	a
			DS 5	0,7	a	0,8	a
		L	INI	51,7			
			C 0	51,5	a	54,2	a
			DS 0	50,4	a	52,6	a
			C 5	51,2	a	56,1	a
			DS 5	48,9	a	52,1	a
		a*	INI	26,8			
			C 0	27,4	a	26,0	a
			DS 0	30,8	ab	28,2	a
			C 5	30,5	ab	27,6	a
			DS 5	31,7	b	29,2	a
		b*	INI	28,5			
			C 0	28,9	a	30,6	a
			DS 0	29,7	a	30,7	a
			C 5	28,9	a	32,7	a
			DS 5	27,6	a	32,8	a
COLOR PULPA		croma	INI	48,6			
			C 0	48,9	a	46,4	a
			DS 0	49,3	a	50,0	b
			C 5	50,4	a	49,8	b
			DS 5	50,2	a	49,1	b
		hue	INI	1,4			
			C 0	1,4	b	1,4	c
			DS 0	1,4	ab	1,3	ab
			C 5	1,4	ab	1,4	b
			DS 5	1,3	a	1,3	a
		L	INI	75,6			
			C 0	75,2	a	77,6	c
			DS 0	76,2	a	74,6	ab
			C 5	74,6	a	75,7	b
			DS 5	74,6	a	73,2	a
		a*	INI	6,5			
			C 0	9,5	a	8,5	a
			DS 0	10,4	ab	11,3	b
			C 5	11,0	b	10,5	b
			DS 5	11,7	b	11,8	b
		b*	INI	48,1			
			C 0	47,8	a	45,6	a
			DS 0	48,1	a	48,6	b
			C 5	49,1	a	48,7	b
			DS 5	48,8	a	47,6	ab

Tabla 5

Tabla 6 (ANEXO 2-5; PDF). Parámetros estándar de calidad en melocotón “Alejandro Dumas”, tras frigoconservación, con y sin retraso en el almacenamiento frigorífico. Medidas semanales más dos días a 20°C. C: lotes control; DS: lotes tratados, INI: inicial o momento de cosecha.

Medias semanales seguidas de distinta letra son significativamente distintas ($p \leq 0.05$; test LSD)

Alejandro Dumas		s0	s1	s2	s3	s4	s5
mg ac. málico/g peso fresco	INI	6,7					
	C 0			6,3 a	6,0 b	5,7 c	4,4 b
	DS 0			5,9 a	5,7 b	5,26 bc	4,7 b
	C 5			5,7 a	3,7 a	2,7 a	1,9 a
	DS 5			5,5 a	5,2 b	4,6 b	4,3 b
CSS zumo (%)	INI	11,1					
	C 0			10,7 a	12,8 b	11,6 ab	11,4 a
	DS 0			11,3 ab	11,3 a	12,8 c	12,3 b
	C 5			11,7 b	11,7 a	10,8 a	10,8 a
	DS 5			12,7 c	11,7 a	12,2 bc	11,3 ab
CSS pulpa/AT	INI	1,7					
	C 0			2,0 a	2,2 a	2,0 a	2,6 a
	DS 0			2,1 a	2,2 a	2,4 ab	2,6 a
	C 5			2,2 a	3,1 b	4,0 c	5,8 b
	DS 5			2,4 a	2,2 a	2,6 b	2,9 a
ul C2H4/kg·h	INI	0,0					
	C 0			3,3 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
	DS 0			2,7 a	6,1 a	12,3 ab	7,2 a
	C 5			9,3 a	6,8 a	10,6 ab	34,2 b
	DS 5			11,7 a	23,2 b	25,0 b	47,9 b
Fmax (N)	INI	44,5					
	C 0			31,3 b	42,0 b	48,3 b	54,0 b
	DS 0			7,9 a	7,2 a	4,8 a	5,6 a
	C 5			40,0 b	37,1 b	40,0 b	45,2 b
	DS 5			8,0 a	6,3 a	6,1 a	4,5 a
COLOR DE FONDO (PIEL)	croma	INI	45,8				
		C 0		51,8 a	51,6 ab	50,6 b	50,3 b
		DS 0		50,2 a	52,1 b	52,1 b	50,6 b
		C 5		50,1 a	49,8 a	47,4 a	46,4 a
		DS 5		54,3 b	53,1 b	54,2 c	50,3 b
	hue	INI	1,2				
		C 0		1,3 a	1,4 a	1,4 a	1,3 a
		DS 0		1,4 a	1,3 a	1,3 a	1,3 a
		C 5		1,4 a	1,3 a	1,3 a	1,4 a
		DS 5		1,3 a	1,4 a	1,3 a	1,4 a
	L	INI	69,5				
		C 0		73,2 a	73,2 a	73,9 b	74,1 b
		DS 0		73,0 a	74,4 ab	73,2 ab	74,3 b
		C 5		72,9 a	73,9 ab	71,4 a	70,3 a
		DS 5		73,5 a	75,3 b	74,6 b	74,1 b
	a*	INI	5,8				
		C 0		12,9 b	11,1 a	10,6 a	11,9 ab
		DS 0		10,6 ab	12,2 a	14,0 b	12,7 b
		C 5		10,2 a	11,5 a	11,0 a	9,6 a
		DS 5		13,1 bc	10,9 a	13,5 b	10,1 ab
	b*	INI	45,1				
		C 0		50,0 a	50,2 ab	49,4 b	48,8 b
		DS 0		48,8 a	50,6 b	50,1 b	48,9 b
		C 5		48,8 a	48,3 a	46,0 a	45,3 a
		DS 5		52,5 b	51,9 b	52,4 c	49,2 b
COLOR PULPA	croma	INI	44,16				
		C 0		44,2 a	47,8 b	46,9 b	45,9 b
		DS 0		47,1 b	50,8 c	48,4 b	45,1 b
		C 5		45,5 ab	44,8 a	41,8 a	39,9 a
		DS 5		51,9 c	48,4 bc	48,9 b	38,0 a
	hue	INI	1,42				
		C 0		1,42 c	1,40 b	1,39 c	1,38 b
		DS 0		1,40 b	1,39 b	1,36 b	1,36 b
		C 5		1,41 bc	1,35 a	1,29 a	1,27 a
		DS 5		1,36 a	1,39 b	1,36 b	1,38 b
	L	INI	80,14				
		C 0		80,1 b	80,4 b	79,3 c	79,0 c
		DS 0		79,6 ab	78,7 ab	76,0 b	76,6 b
		C 5		80,1 ab	76,9 a	69,5 a	68,9 a
		DS 5		77,9 a	78,8 ab	76,8 b	76,0 b
	a*	INI	6,51				
		C 0		6,5 a	8,4 a	8,7 a	8,9 ab
		DS 0		8,3 b	9,3 a	10,5 b	9,3 b
		C 5		7,6 ab	9,9 a	11,7 b	11,7 c
		DS 5		11,2 c	9,0 a	10,4 b	7,4 a
	b*	INI	43,85				
		C 0		43,6 a	47,0 b	46,1 b	45,0 b
		DS 0		46,3 b	49,9 c	47,2 b	44,1 b
		C 5		44,8 ab	43,7 a	40,1 a	38,0 a
		DS 5		50,7 c	47,5 bc	47,7 b	37,3 a

Tabla 6

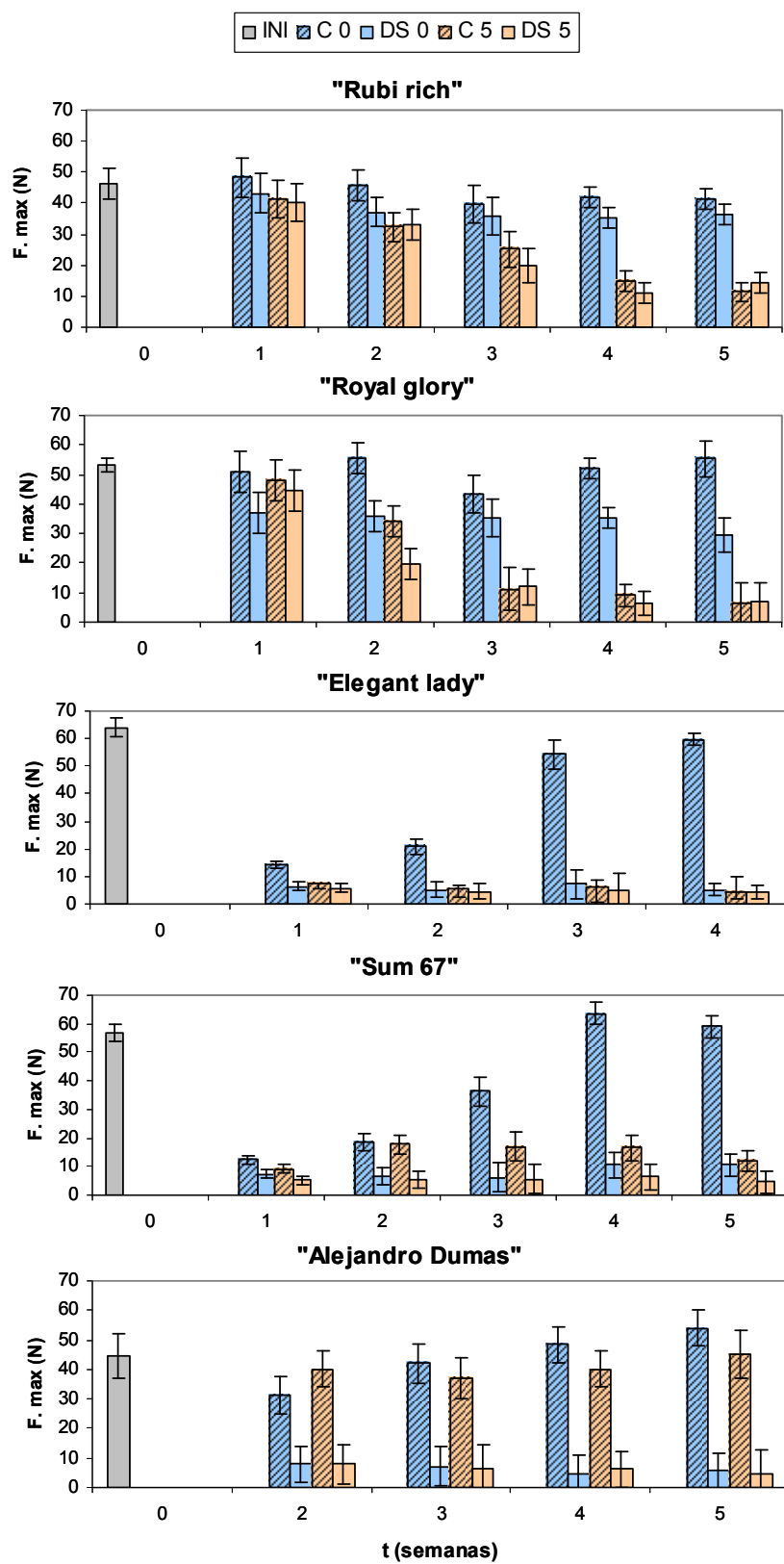
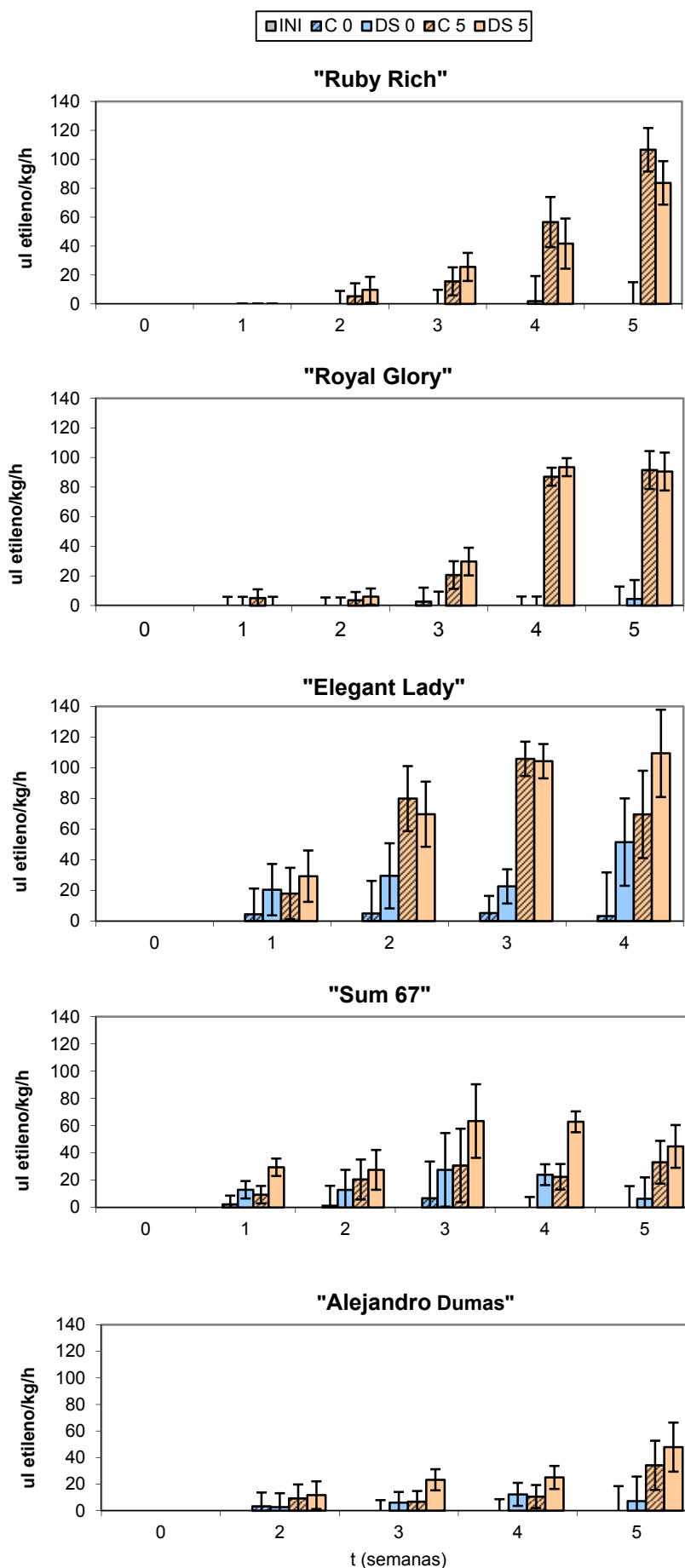


Figura 15: Evolución de la firmeza. Barras de error LSD ($p \leq 0.05$).
C: lotes control; DS: lotes tratados (protocolo de premaduración)



**Figura 16: Evolución de la producción de etileno. Barras de error LSD ($p \leq 0.05$).
C: lotes control; DS: lotes tratados (protocolo de premaduración)**

	C 0	DS 0	C 5	DS 5	
"Rubi rich"	0	0	106,63	83,69	s 5
"Royal glory"	0	4,36	91,53	90,57	s 5
"Elegant lady"	3,23	51,46	69,56	109,39	s 4
"Sum 67"	6,72	27,6	30,76	63,38	s 3
"Alejandro Dumas"	0	7,24	34,16	47,86	s 5

pico climatérico

Tabla 7: Producciones máximas medias de etileno (μl etileno/kg*h).

Siento s: semanas de frigoconservación

3.3.2.1. ESTUDIO 2A: EFECTO DEL TIEMPO Y LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN FRIGORÍFICA EN LA EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD.

La alteración de la firmeza durante la frigoconservación fue uno de los cambios más importantes observados. La tendencia de este parámetro es a disminuir progresivamente durante la conservación frigorífica. Desviaciones de esta tendencia pueden dar pistas del desarrollo de daños por frío. Así, descensos de pulpa por debajo de 8N pueden indicar pulpa fundente, lanosidad o harinosidad (*melty* o *woolly-mealy*) (Lurie & Crisosto, 2005) y textura de cuero (*leathery*) en frutos que mantienen la firmeza por encima de 30N (Neves et al., 2013). En ambos casos, tanto los frutos "*melty*" o "*woolly/mealy*" como los frutos "*leathery*", muestran una pulpa poco jugosa (Luza et al., 1992).

Se observa un descenso progresivo de la firmeza en "Ruby Rich" y "Royal Glory" en frutos conservados a 5°C, siendo este descenso más acusado en la variedad "Royal Glory". La conservación frigorífica a 0°C mantuvo altos niveles de firmeza en ambas variedades. En las variedades "Elegant Lady" y "Sum 67", se observa una gran alteración durante la conservación frigorífica, produciéndose un descenso brusco de la firmeza de los frutos tras 1 semana de conservación tanto a 0 como a 5°C. Tras una semana de conservación a 0°C se produce un incremento progresivo de la firmeza indicando alteraciones en su estructura tipo "*leathery*". El mantenimiento de la firmeza por debajo de 8N desde la semana 1 en frutos conservados a 5°C indica, al menos, "*melthy flesh*". En la variedad "Alejandro Dumas" los frutos conservados a 0°C mantuvieron su firmeza en valores similares a los presentados tras la recolección. Sin embargo mostró ser una variedad de pulpa fundente ("*melthy flesh*") cuando su temperatura de conservación fue de 5°C (Fig. 15).

La pérdida de firmeza es debida a la hidrólisis de la pared celular que a su vez está promovida por etileno (Dong et al., 2001). Eso es justamente lo que se observa en la mayoría de las variedades. La producción de etileno en las variedades “Ruby Rich”, “Royal Glory”, “Elegant Lady” y “Sum 67”, una vez transferidas a 20°C, es inversa a los valores de firmeza. El frío es un estrés y el estrés promueve la producción de etileno (Kader, 2007). Observamos que 5°C supone a los frutos más estrés y esto explica que a producción de etileno al transferir los frutos a 20°C sea mayor a 5 que a 0°C. Sin embargo, en la variedad “Alejandro Dumas” la producción de etileno no es inversa a los valores de firmeza y en general baja al transferir los frutos a 20°C (Fig. 16). Esto puede ser síntoma de daño severo y bloqueo en la maduración (las nectarinas con daño severo disminuyen su tasa de producción de etileno (Zhou et al., 2001)) o el pequeño repunte en la semana 5 puede indicar que el fruto necesite algún día más a 20°C para restaurar su maduración (otros grupos han estudiado la transferencia a 20°C hasta durante 8 días (Zhou et al. 2001) en nectarina).

El CSS se mantuvo relativamente constante a lo largo de la frigoconservación en las variedades “Ruby Rich”, “Elegant Lady” y “Sum 67”, tanto a 0°C como a 5°C (Tablas 2, 4 y 5). Generalmente durante la conservación frigorífica no suele disminuir el CSS de los frutos e incluso se han descrito casos en los que se observan ligeros incrementos del mismo (Crisosto & Crisosto, 2005). Este incremento es el que se observa en “Royal Glory” y “Alejandro Dumas”. En “Royal Glory” además se existe un efecto de la temperatura de conservación, siendo mayor el incremento del CSS en los frutos conservados a 0°C que en aquellos conservados a 5°C (Tablas 3 y 6).

La acidez descendió en todas las variedades a lo largo de la frigoservación (Tablas 2, 3, 4, 5 y 6) debido a la oxidación de los ácidos orgánicos (Crisosto & Crisosto, 2005). Siendo más acusado ese descenso a 5°C en la variedad “Ruby Rich” (Tabla 2). Se observa un efecto de la temperatura de conservación en las variedades “Ruby Rich”, “Royal glory”, “Elegant Lady” y “Sum 67”, manteniendo niveles de AT superiores en los frutos conservados a 0°C que en aquellos conservados a 5°C.

La relación CSS/AT incrementó a lo largo de la frigoconservación en las variedades “Royal glory”, “Elegant Lady”, “Sum 67” y “Alejandro Dumas” (Tablas 2, 3, 4, 5 y 6). En “Sum 67” y “Alejandro Dumas” se observa un efecto de la temperatura de conservación, siendo los valores de este parámetro superiores a 5°C que a 0°C (Tabla 5 y 6). En “Ruby Rich” sin embargo, la

relación CSS/AT disminuye con la conservación, siendo ese descenso más acusado a 5°C. (Tabla 2).

A diferencia de lo observado por (Cano-Salazar, 2012) en la medida del color en melocotones y nectarinas, en las variedades de este estudio, no sólo resulta más informativa la evolución del parámetro a^* , sino también la evolución del parámetro croma tanto en piel (color de fondo) como en pulpa. En todas las variedades el parámetro a^* y/o el parámetro croma incrementan con la conservación tanto en piel como en pulpa (Tablas 2, 3, 4, 5 y 6). En las variedades “Ruby Rich” y “Royal Glory” se observa un efecto de la temperatura, siendo dicho incremento superior en frutos conservados a 5°C respecto a frutos conservados a 0°C. En la variedad “Ruby Rich” ver croma en piel y pulpa (Tabla 2). Y en la variedad “Royal Glory” ver croma en piel, croma y a^* en pulpa (Tabla 3).

3.3.2.2. ESTUDIO 2B: EFECTO DEL TRATAMIENTO POSTCOSECHA (ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO) EN LA EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD.

En todas las variedades, tal y como se esperaba, se observa un descenso de la firmeza en frutos tratados frente a frutos control. En las variedades “Elegant Lady” y “Sum 67” parece mitigar las alteraciones de textura observadas en frutos control a 0°C pero sin embargo el descenso de firmeza sufrido por “Elegant lady” es demasiado alto en todas las condiciones de conservación (Fig. 15).

La maduración promueve la producción de etileno (Kader, 2007). Tal y como se esperaba en este caso también, los frutos tratados tienden a producir más etileno que los frutos control, aunque esas diferencias no son significativas. La única variedad que invierte esa tendencia es “Ruby Rich” a 5°C (Fig. 16).

En cuanto al CSS, en la mayoría de las variedades no se observan diferencias entre los frutos control y los frutos con tratamiento DS, manteniéndose en ambos casos a lo largo de la conservación (Tablas 2, 3, 4, 5 y 6) y siendo coincidentes estos resultados con lo observados por (Infante et al., 2009). En la variedad “Royal Glory” observamos un sutil incremento en los frutos tratados respecto a frutos control en la frigoconservación a 0°C (Tabla 3). Los mayores cambios en el CSS se produjeron en la variedad tardía “Alejandro Dumas”, observándose un

ligero incremento del CSS de los frutos durante la conservación frigorífica, y un efecto significativo del tratamiento, con valores de CSS superior en los frutos tratados (DS) a ambas temperaturas de conservación (Tabla 6).

El descenso en la acidez con el tiempo de conservación ocurrió de la misma manera en frutos tratados y en frutos control (Tablas 2, 3, 4, 5 y 6) coincidiendo con los resultados de estudios previos (Crisosto & Crisosto, 2005; Infante et al., 2009). Excepcionalmente en “Alejandro Dumas” se observó un descenso muy superior en frutos C5 que podría estar asociado a daño por frío (Tabla 6).

El incremento en la relación CSS/AT a lo largo de la frigoconservación tuvo un comportamiento similar en los frutos control que en los frutos tratados. Sólo en los frutos “Sum 67”, a final de la frigoconservación, se observan valores superiores en frutos tratados que en los frutos Control. Este incremento en frutos sometidos a acondicionamiento térmico frente a frutos control (Tablas 2, 3, 4, 5 y 6) coincide con lo observado por (Crisosto & Crisosto, 2005) en melocotón y (Cano-Salazar, 2012) en nectarina.

En todas las variedades el parámetro a^* y/o el parámetro croma incrementan con la conservación tanto en piel (color de fondo) como en pulpa. En las variedades “Elegant Lady”, “Sum 67” y “Alejandro Dumas” se observa un efecto del tratamiento, siendo dicho incremento superior en frutos acondicionados (DS) respecto a frutos sin acondicionar (C). Para la variedad “Elegant Lady” ver croma en piel y a^* en pulpa (Tabla 4). Para la variedad “Sum 67” ver croma y a^* en pulpa (Tabla 5). Y para la variedad “Alejandro Dumas” ver a^* en piel y croma en pulpa (Tabla 6).

EVOLUCIÓN DAÑOS INTERNOS

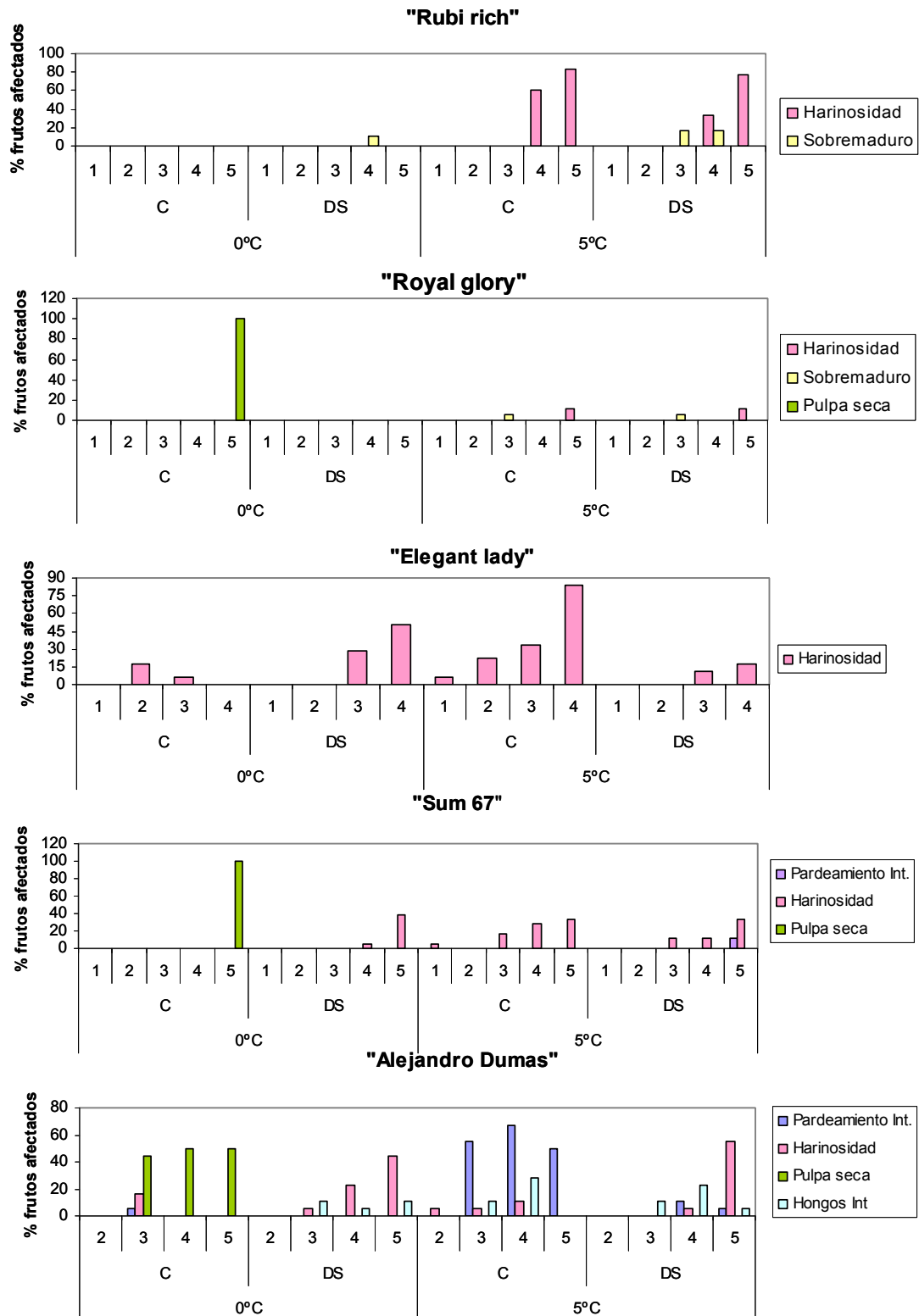


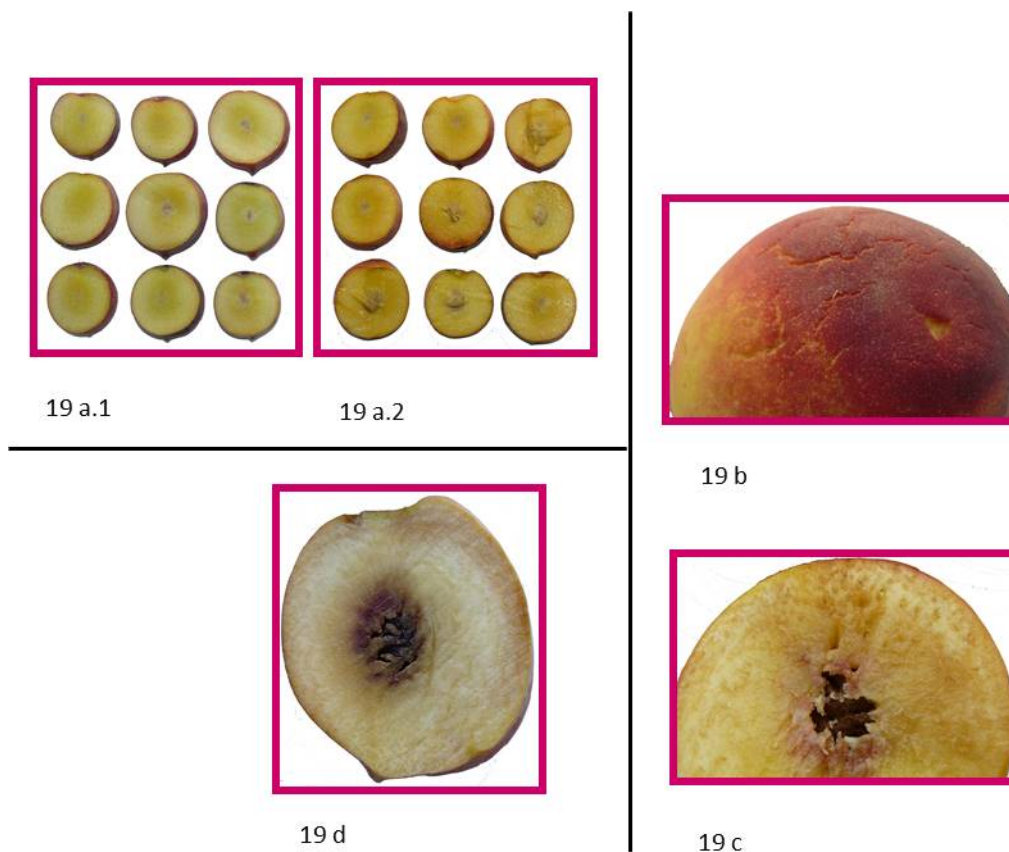
Figura 18: Evolución de las distintas fisiopatías internas producidas por daño de frío.
C: lotes control; DS: lotes tratados (protocolo de premaduración)

Figura 19a: variedad "Royal Glory" a las cuatro semanas de conservación a 0°C. A la izquierda el control muestra el desarrollo de pulpa seca y a la derecha el DS muestra la pulpa jugosa.

Figura 19b: variedad "Elegant Lady". Desarrollo de grietas epidérmicas a las 4 semanas de conservación a 5°C.

Figura 19c: Variedad "Elegant Lady". Desarrollo de harinosidad a las 4 semanas de conservación a 5°C.

Figura 19d: Variedad "Alejandro Dumas". Desarrollo de pardeamiento interno a las 5 semanas de conservación a 5°C.



Teniendo en cuenta los límites de tolerancia para los parámetros estándar de calidad (principalmente la firmeza; >27N) y para los daños internos y externos (<25%), definimos la vida útil para cada variedad y condición ensayada (Tabla 8)

	C 0	DS 0	C 5	DS 5	
"Rubi rich"	5	5	3	3	sensible
"Royal glory"	4	5	5	5	resistente
"Elegant lady"	>4	2	1	1	muy sensible
"Sum 67"	3	4	3	4	sensible
"Alejandro Dumas"	2	2	2	1	muy sensible

Tabla 8: Vida útil en semanas.

La sensibilidad al daño por frío en melocotón mostró un fuerte componente varietal.

La variedad temprana “**Rubi Rich**” fue susceptible al desarrollo de “harinosidad” en los frutos conservados a 5°C. El proceso de frigoconservación disminuyó en un 50% la presencia de esta fisiopatía tras cuatro semanas de conservación. El acondicionamiento térmico incrementó la susceptibilidad al desarrollo fúngico, especialmente en los frutos conservados a 0°C. En esta variedad, la producción de etileno en frutos conservados a 0°C fue exigua, mientras que en los frutos conservados a 5°C se produce un progresivo incremento en la producción de etileno hasta alcanzar valores máximos en la quinta semana de conservación (Fig. 16 y Tabla 7). Este incremento a 5°C es especialmente significativo en frutos no tratados, lo que hace pensar que se trata de un *síntoma de daño por frío*. El descenso de la firmeza en frutos conservados a 5°C fue inversamente proporcional a la producción de etileno. Sin embargo, los frutos conservados a 0°C mantuvieron los valores de firmeza durante las cinco semanas de conservación (Fig. 15). Del mismo modo, a partir de la cuarta semana, se observó un descenso significativo ($p<0,05$) de la acidez en frutos conservados a 5°C. La conservación a 5°C produjo una evolución en la coloración de los frutos que se manifestó en un incremento significativo ($p<0,05$) de los valores de croma tanto en la piel (color de fondo) como en el color de la pulpa, debido en el caso de la piel a un incremento significativo de los parámetros a^* y b^* y en el caso de la pulpa a un incremento significativo del parámetro b^* (Tabla 3).

La variedad temprana “**Royal Glory**” fue susceptible al desarrollo de “pulpa seca” en frutos conservados a 0°C. El acondicionamiento térmico evitó el desarrollo de esta fisiopatía (Fig. 18 y 19a). La producción de etileno fue inapreciable en los frutos almacenados a 0°C, mientras que en los frutos conservados a 5°C se observó un incremento hasta alcanzar valores máximos a las cuatro y cinco semanas (Fig. 16 y Tabla 7). Los frutos conservados a 0°C, no sometidos a tratamiento, mantuvieron la firmeza durante las cinco semanas de conservación. El acondicionamiento térmico indujo, a esta temperatura, un descenso de la misma. Tras dos semanas de conservación se produce un descenso significativo de firmeza a 5°C ($p<0,05$), tanto por la temperatura de almacenamiento como por la aplicación del tratamiento. En frutos conservados a 5°C, el fuerte descenso de la firmeza a la tercera semana de almacenamiento puede ser limitante para su comercialización (Fig. 15). La conservación a 5°C provocó la evolución de color tanto en la piel como en la pulpa, mostrando incrementos significativo ($p<0,05$) del croma en los frutos conservados a 5°C desde la tercera semana de conservación. La acidez titulable disminuye ligeramente a lo largo del proceso en todas las condiciones ensayadas (Tabla 4).

“Elegant Lady”; variedad de media estación, fue susceptible al desarrollo de “grietas epidérmicas” y “harinosidad” en frutos conservados a 5°C (Fig. 19b y 19c). El acondicionamiento térmico no mejoró la conservación a 0°C. Sin embargo, a 5°C sí se observó una sustancial atenuación en el desarrollo de esta fisiopatía por la aplicación del tratamiento (Fig. 18). Fue una de las variedades que mostró una mayor producción de etileno detectándose ya desde la primera semana en todas las condiciones ensayadas. La producción de etileno fue superior en frutos conservados a 5°C, obteniéndose un máximo tras tres semanas de conservación (Fig. 16 y Tabla 7). Tras una semana de conservación frigorífica, la variedad “Elegant Lady” mostró un brusco descenso de la firmeza en todas las condiciones ensayadas. A partir de la segunda semana, los frutos conservados a 0°C y no sometidos a acondicionamiento térmico experimentan un progresivo incremento en la firmeza de la pulpa hasta alcanzar niveles similares a los valores iniciales (leatheriness), mientras que en el resto de condiciones ensayadas se mantiene los bajos niveles de firmeza alcanzados tras la primera semana de conservación (melting flesh) (Fig. 15). Durante el proceso de frigoconservación se produjo una evolución del color de fondo de la piel observándose un incremento en los valores de croma por la aplicación del tratamiento a partir de la segunda semana de conservación. La concentración de ácido málico disminuyó durante el proceso de conservación frigorífica en todas las condiciones ensayadas y significativamente en frutos conservados a 5°C (Tabla 4).

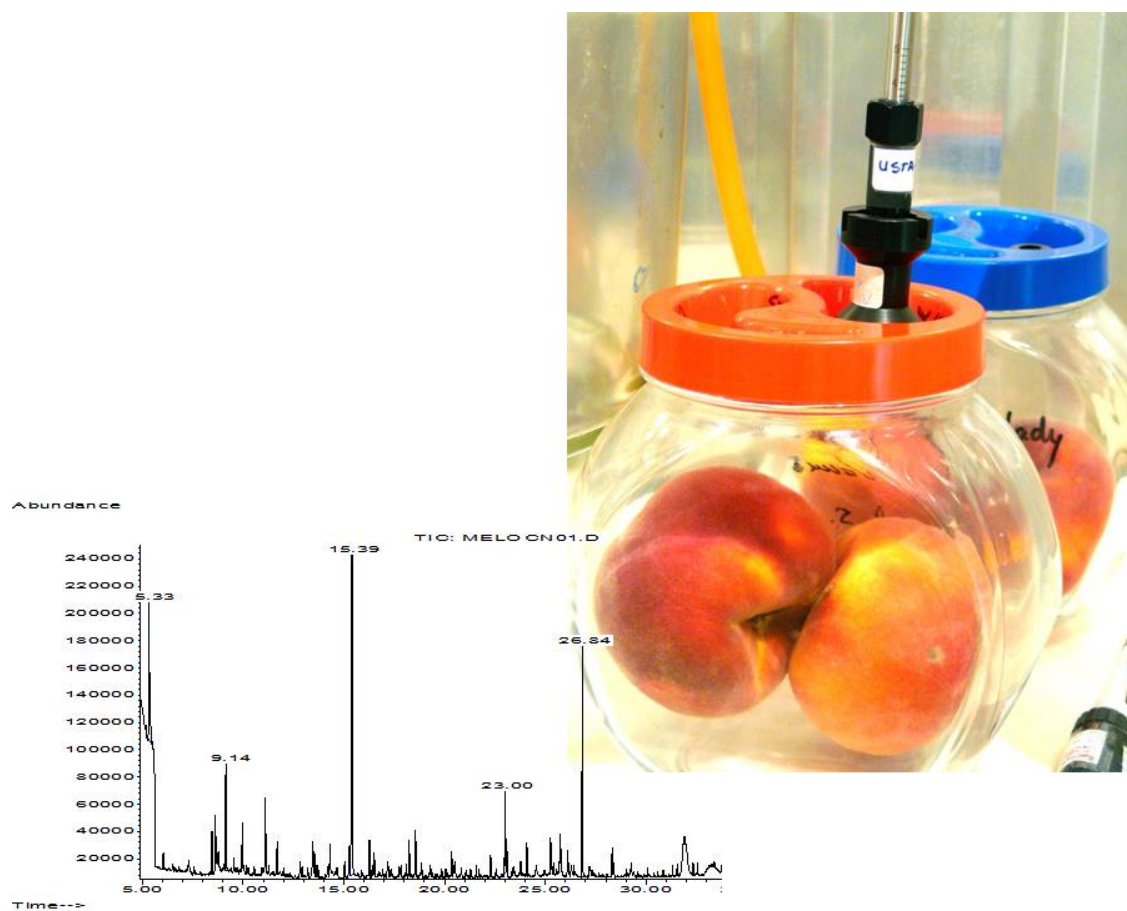
La variedad de media estación **“Sum 67”** se mostró susceptible al desarrollo de “pulpa seca” en frutos conservados a 0°C y no sometidos a acondicionamiento térmico. Sin embargo, la aplicación del tratamiento evitó el desarrollo de esta fisiopatía. Esta variedad también mostró una ligera susceptibilidad al desarrollo de harinosidad (Fig. 18). Se observó un incremento en la producción de etileno con la temperatura de conservación y por la aplicación del tratamiento, alcanzándose valores máximos tras tres semanas de conservación (Fig. 16 y Tabla 7). La evolución de la firmeza en esta variedad fue muy similar a la descrita para “Elegant Lady”, observándose un brusco descenso en todas las condiciones ensayadas tras una semana de frigoconservación (melting flesh) y un incremento progresivo en frutos conservados a 0°C sin premaduración a partir de la segunda semana hasta alcanzar niveles similares a los iniciales (leatheriness) (Fig. 15). Durante el proceso de frigoconservación no se observó evolución en el color de la piel (color de fondo), si en el de la pulpa, siendo el croma superior en frutos tratados que en frutos control, debido al incremento del parámetro a^* . La acidez de estos frutos fue la más baja de las variedades objeto de estudio ($\approx 3\text{mg/g fw}$), aun así continuó

disminuyendo durante el proceso de conservación en todas las condiciones ensayadas (Tabla 5).

La variedad tardía “**Alejandro Dumas**” fue muy susceptible al desarrollo de “pulpa seca” en frutos conservados a 0°C y al desarrollo de “pardeamiento interno” en frutos conservados a 5°C (Fig. 19d). El acondicionamiento térmico disminuyó la incidencia de ambos daños (Fig. 18). La producción de etileno en esta variedad se detectó tras dos semanas de conservación frigorífica, mostrando un incremento significativo en los frutos conservados a 5°C y sometidos a acondicionamiento térmico desde la tercera semana. La producción máxima de etileno en esta variedad fue la más baja de las variedades ensayadas (Fig. 16 y Tabla 7). Tras dos semanas de frigoconservación la firmeza de los frutos tratados disminuyó bruscamente. Sin embargo, los frutos no sometidos a acondicionamiento térmico mantuvieron niveles de firmeza similares a los iniciales (Fig. 15). Durante la conservación se observó, tanto en la piel como en la pulpa, un incremento significativo del parámetro croma en todas las condiciones ensayadas excepto en los frutos conservados a 5°C sin tratar, donde se observó un descenso significativo de dicho parámetro tanto en pulpa como en piel. Igualmente, en frutos frigoconservados a 5°C no sometidos a acondicionamiento térmico, se registró un brusco descenso de la acidez (Tabla 6). Tanto la decoloración interna y externa, como el descenso brusco de acidez en la condición C5 nos hace pensar que se trata de *síntomas de daño por frío*.

Hay una serie de consideraciones técnicas que sería importante tener en cuenta si se decide utilizar este tratamiento postcosecha:

- Se precisa realizar un estricto control del proceso de ablandamiento cuando se someten los frutos a acondicionamiento térmico, así como su realización sobre poblaciones homogéneas de frutos que disminuyan la variabilidad de los resultados.
- Se requiere de eficaces sistemas de refrigeración que disminuyan rápidamente la temperatura de los frutos tratados hasta la temperatura óptima de conservación (0°C).
- El proceso de premaduración puede facilitar un mayor desarrollo de podredumbres en los frutos. Crisosto et. al., 2004 recomiendan la aplicación de fungicidas postcosecha para la utilización de estos protocolos. Desafortunadamente el sector de fruta de hueso nacional no dispone de fungicidas registrados para su aplicación durante la aplicación de protocolos de acondicionamiento térmico.



BLOQUE 2: ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO Y AROMA

4. BLOQUE II:

ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO Y AROMA

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. PREMADURACIÓN

Como ya se ha comentado, el “acondicionamiento térmico”, “pre-maduración”, “retraso en el almacenamiento frigorífico” o “prealmacenamiento” en fruta de hueso es un tratamiento postcosecha que retrasa y limita el desarrollo de daños por frío. Este tratamiento puede utilizarse además para premadurar variedades que, aunque no sean sensibles a daño por frío, hayan sido cosechadas en estados inmaduros. Con la aplicación de protocolos de acondicionamiento térmico se podrá ofrecer al consumidor frutos con mejor sabor y una textura más adecuada (Crisosto, 2004). Los cambios físicos y químicos que se producen en los melocotones acondicionados permiten mejorar la calidad de la fruta y consecuentemente incrementar el grado de aceptación del consumidor (Crisosto, 2004).

4.1.2. AROMA

En la fruta, el aroma es una mezcla compleja de un gran número de compuestos volátiles cuya composición es específica de cada especie y variedad (Tomas-Barberan & Robins, 1997). La formación de estos compuestos es un proceso dinámico a lo largo del crecimiento y la maduración del fruto.

Las concentraciones de los compuestos volátiles en melocotones y nectarinas dependen esencialmente del grado de madurez de los frutos (Engel et al., 1988; Meredith et al., 1989; Horvat et al., 1990; Chapman et al., 1991; Visai & Vanoli, 1997; Lavilla et al., 2001). Y el perfil de compuestos volátiles en melocotón es dependiente de la variedad (Engel et al., 1988); (Horvat et al., 1990), de factores agronómicos (Derail et al., 1999; Sumitani et al., 1994), de las condiciones de almacenamiento (Robertson et al., 1990), del estado de madurez y/o de las condiciones de madurez (Aubert et al., 2003; Lavilla et al., 2001).

La contribución de cada compuesto al aroma no depende sólo de su cantidad absoluta, sino que debe estar presente en una concentración superior a su umbral de percepción

(Buttery & Ling, 1993). Cada compuesto volátil está caracterizado por un umbral olfativo (que varía de ppb a ppm) y en función de éste contribuirá más o menos al aroma.

La mayoría de compuestos volátiles son originados a partir de ácidos grasos saturados e insaturados, formados por β -oxidación y a través de la ruta de la lipoxigenasa (Akoh et al., 2002). Los avances en el campo de la biosíntesis de compuestos volátiles han permitido la identificación de nuevas rutas metabólicas (Schwab et al., 2008) (Fig 21 y 22).

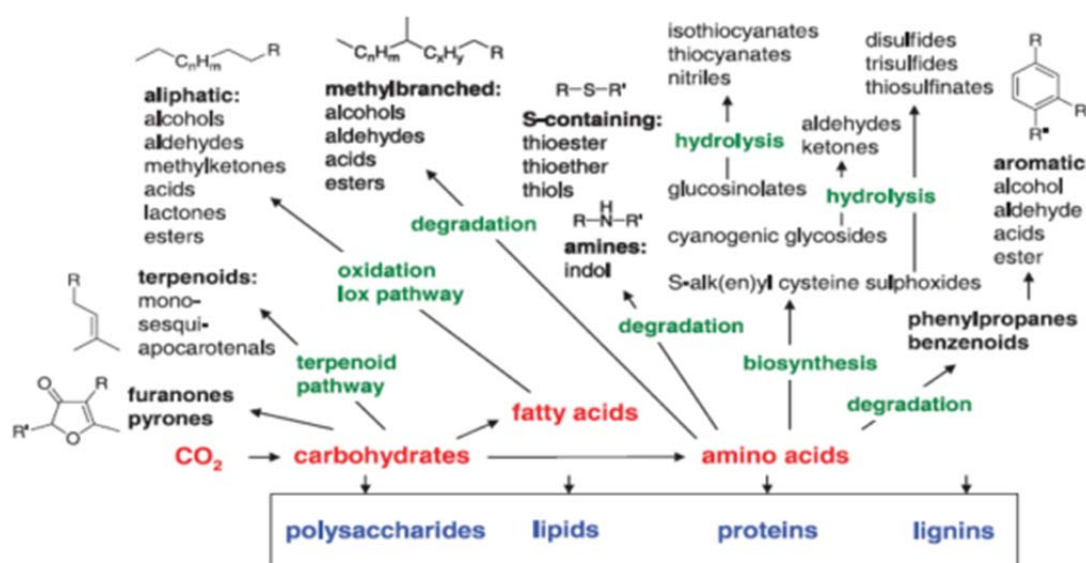


Figura 21: Producción de compuestos volátiles y sus rutas metabólicas (Schwab et al., 2008)

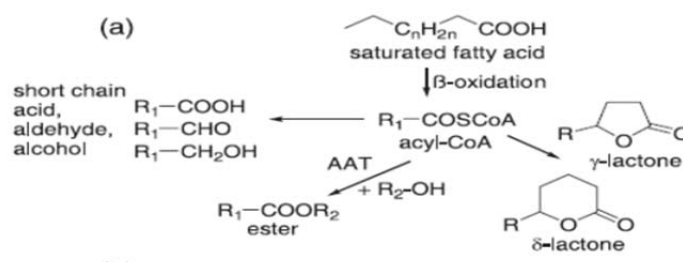


Figura 22: Biosíntesis de ácidos de cadena corta, aldehídos, alcoholes, ésteres y lactonas (Schwab et al., 2008)

El aroma es uno de los factores esenciales que contribuyen a la calidad de melocotones y nectarinas (Aubert et al., 2003; Infante et al., 2008) . La aceptación sensorial del melocotón está fuertemente asociada a la percepción de su aroma característico (Ortiz et al., 2009), que a su vez está relacionado con la emisión de una serie de compuestos volátiles, siendo las lactonas γ y δ las principales responsables (Engel et al., 1988; Spencer et al., 1978). Los efectos beneficiosos de la presencia de estas lactonas en la maduración han sido indicados por numerosos investigadores (Aubert et al., 2003; Chapman et al., 1991; Lavilla et al., 2002; Robertson et al., 1990; Visai & Vanoli, 1997; Rizzolo et al., 2006; Zhang et al., 2010a).

El almacenamiento frigorífico altera la emisión de compuestos volátiles. Puede inhibir parcialmente la síntesis de ésteres, debido en gran parte a una deficiencia de sustratos causada por la supresión de procesos oxidativos (Ortiz et al., 2009; Raffo et al., 2008; Robertson et al., 1990). Y a su vez, se ha demostrado que el almacenamiento a 20°C después de la frigoconservación incrementa el contenido total de lactonas en melocotones (Zhang et al., 2011). Por el contrario, se han observado en algunas variedades de melocotón niveles significativamente más bajos de compuestos volátiles en frutos que presentaban daño por frío (Zhang et al., 2011).

4.1.3. PREMADURACIÓN Y AROMA

Es conocido que el acondicionamiento térmico a 20°C previo a la frigoconservación alarga la vida útil de melocotones susceptibles a daño por frío (Crisosto, 2004). Sin embargo, estudios previos del grupo nos han permitido observar que en ocasiones la aplicación de este tratamiento postcosecha produce un incremento en la calidad que no es detectable mediante el análisis de los parámetros estándar de calidad (un incremento de sabor y aroma) y que no necesariamente se encuentra asociado a un incremento de vida útil, especialmente en el caso de variedades con sensibilidad extrema o con una marcada resistencia. Recientemente se ha demostrado que el acondicionamiento térmico a 20°C, previo a la conservación a 0°C, favorece el desarrollo de aromas en melocotón (Cano-Salazar et al., 2013).

Por ello, en este bloque se analizará la evolución postcosecha del perfil de emisión de volátiles en dos variedades de melocotón (“Elegant Lady”; muy sensible al daño por frío y “Royal Glory”; resistente) para evaluar el posible efecto del acondicionamiento térmico previo a la frigoconservación en un aspecto tan importante de la calidad organoléptica como es el aroma.

Se abordan así los siguientes objetivos en el Bloque II:

- Descripción de la evolución del perfil de aromas de la variedad más sensible (“Elegant Lady”) y más resistente (“Royal glory”), asociado a cada condición de conservación.
- Valoración de la aplicación del tratamiento en la mejora del aroma sin detrimento de su calidad comercial.

El plan de trabajo para este bloque se basa en tres estudios llevados a cabo con parte del material recolectado en la primera campaña frutícola (variedades en negrita)

campana 1 (2007)	Ensayo 1 13/junio	Ensayo 2 23/julio	Ensayo 3 05/septiembre
MELOCOTÓN	Ruby Rich	Elegant Lady	Alejandro Dumas
	Royal Glory	Sum 67	
campana 2 (2008)	Ensayo 1 16/junio	Ensayo 2 15/julio	Ensayo 3 29/agosto
MELOCOTÓN	Royal Glory	Elegant Lady	Alejandro Dumas

Estudio 1. Descripción del perfil de aromas para cada variedad en el momento de la cosecha.

Estudio 2. Perfiles de emisión de compuestos volátiles de cada variedad durante la conservación.

A. Evolución cuantitativa.

B. Evolución cualitativa.

Estudio 3. Efecto del tiempo y temperatura de conservación frigorífica y del tratamiento postcosecha (acondicionamiento térmico) en la emisión de compuestos volátiles.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Tal y como se describió en el bloque I ([epígrafe 3.2.1](#)), la fruta se cosechó, seleccionó, transportó y almacenó en cámaras frigoríficas con control de temperatura y humedad relativa. La frigoconservación de ambas variedades se llevó a cabo con acondicionamiento térmico (DS) y sin él (C) y a dos temperaturas distintas; 0°C y 5°C.

4.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Al igual que sucede con la detección de daños por frío, es necesaria la exposición de los frutos a 20°C tras un almacenamiento frigorífico prolongado para estimular su producción de aromas. Así, la emisión de volátiles fue monitorizada semanalmente (tras un día a 20°C en las variedades tempranas y tras dos días a 20°C en las variedades de media estación y tardías) en cada condición de conservación hasta un máximo de cinco semanas.

La falta de disponibilidad del cromatógrafo CG-MS en el momento de la recolección de “Elegant Lady” hizo que fuera necesario restringir los puntos análisis postcosecha a las semanas 3 y 4.

4.2.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.2.3.1. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VOLÁTILES CON SPME (MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA)

Para la obtención de volátiles de melocotón, dos frutos por cada muestra fueron introducidos en el interior de un frasco de vidrio de 1660mL, provisto de cierre hermético y septum para facilitar la extracción de volátiles. Los frascos atemperados y acondicionados en cámara de 20°C fueron cerrados durante 75 minutos. La producción de volátiles fue analizada por triplicado para cada condición ensayada. Tras 60 minutos desde el cierre de los frascos se introdujo una jeringa provista de una fibra recubierta de 65µm PDMS/DVB (SUPELCO Bellefonte, PA, USA), permaneció expuesta durante 15 minutos a la atmósfera interna generada. Transcurrido el tiempo de muestreo se extrajo la jeringa del interior del frasco y se introdujo en el inyector de un cromatógrafo de gases, desorbiendo los analitos durante 2 minutos a 240°C. Previamente a cada exposición de la fibra, esta fue limpiada de restos de volátiles manteniéndola en el inyector a 240°C durante 5 min. 5 µL de una disolución de 2-

octanona a una concentración de 0,163 µg/mL fue añadida en el interior de cada frasco como patrón interno.

Los volátiles fueron determinados en un cromatógrafo de gases Agilent 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973MSD (Palo Alto, CA USA). La separación cromatográfica fue realizada con una columna capilar DB WAXetr (60 m x 0,321mm x 0,25µm) J&W Scientific, CA.USA, utilizando helio como gas portador, en modo “splitless”, a un flujo constante de 1,5 mL/min. El programa de temperaturas para el horno fue: Inyector 240°C. Temperatura inicial 40°C (mantenida 4 minutos). 4°C/min. hasta 110°C. 6°C/min. hasta 180°C. 8°C/min. hasta 230°C, mantenido durante 2 minutos. La ionización fue por impacto electrónico y el detector consistía en un filtro de masas cuadrupolar. Los cromatogramas fueron obtenidos en modo barrido (“scan”) en un rango de masas desde 25 hasta 600 uma.

Las áreas de los compuestos analizados se cuantificaron mediante el programa informático Chemstation (Agilent Tech.) y se identificaron por su tiempo de retención, orden de elución y comparación de su espectro de masas con los correspondientes de las librerías NIST05 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, USA) Wiley 275 Mass Spectral Library (John Wiley & Sons, NY. USA), integradas en el programa informático.

La cuantificación de cada compuesto fue relativa a la del patrón interno, sabiendo que los 5µL de patrón que se añadieron a cada frasco contenían 0,818 ng de octanona y generaban un pico de 810000 cuentas de área. Los datos fueron normalizados para cada caso en función del peso de la muestra empleada.

4.2.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se evaluó, para cada familia de compuestos y para cada compuesto individual, el efecto de la temperatura de conservación y del tratamiento (acondicionamiento térmico), mediante análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias empleando el test LSD (Least Significant Difference, $p \leq 0.05$) en tiempos constantes (semanas de conservación), utilizando modelado lineal general multivariante (GLM) del programa estadístico SPSS.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo del ensayo se han identificado 57 compuestos en la variedad “Elegant Lady”; 30 esteroides, 1 cetona, 5 terpenos, 4 alcanos, 6 aromáticos, 7 alcoholes, 3 lactonas y 1 furano. Siendo los esteroides los compuestos mayoritarios. En la variedad “Royal Glory” se identificaron 47 compuestos; 20 esteroides, 7 terpenos, 4 alcanos, 6 aromáticos, 6 alcoholes, 3 lactonas y 1 furano. Siendo los terpenos los compuestos mayoritarios.

4.3.1. ESTUDIO 1: DESCRIPCIÓN DEL PERFIL DE AROMAS PARA CADA VARIEDAD EN EL MOMENTO DE LA COSECHA.

En el momento de la cosecha el perfil de emisión de compuestos volátiles para cada variedad fue el siguiente.

GR	TR	compuesto	Royal glory		Elegant lady	
			media	desv std	media	desv std
CE	4,95	acetone			-	-
TRP	9,14	α - pinene	4,05	0,33	22,42	4,26
TRP	12,00	β -pinene	tr	tr	1,56	0,58
TRP	13,53	carene	0,90	0,12	tr	tr
TRP	14,14	α -phellandrene	-	-	-	-
TRP	15,38	dl-limonene	18,72	3,64	4,29	0,67
TRP	26,84	linalool	9,13	2,23		
TRP	31,31	α -farnesene	tr	tr		
ALC	8,44	decane	1,36	0,25	0,94	0,23
ALC	15,27	dodecane	1,15	0,09	1,39	0,36
ALC	25,25	pentadecane	1,30	0,18	6,80	1,03
ALC	30,07	heptadecane	tr	tr	1,33	0,09
ARO	9,95	toluene	1,93	0,32	5,71	0,25
ARO	13,44	1,3-dimethylbencene	1,43	0,10	3,13	1,87
ARO	15,04	1,4-dimethylbencene	0,59	0,05	0,89	0,55
ARO	17,76	styrene	tr	tr	1,97	0,94
ARO	18,09	o-cymene	tr	tr	tr	tr
ARO	18,55	trimethylbencene	1,90	0,11	3,40	1,65
AOH	6,90	2-propanol	-	-	-	-
AOH	7,09	ethanol			-	-
AOH	13,07	1-methoxy-2-propanol	-	-	-	-
AOH	13,66	1-butanol	-	-	0,81	0,09
AOH	15,93	3-methyl-1butanol	-	-	-	-
AOH	22,81	2-hexen-1-ol	-	-	tr	tr
AOH	23,21	2-octanol			-	-
AOH	25,29	2-ethyl-1-hexanol	-	-		
LAC	29,25	butyrolactone	tr	tr		
LAC	30,79	γ -ethylbutyrolactona			0,58	0,15
LAC	39,17	δ -decalactone	-	-	-	-
LAC	38,44	γ -decalactone	-	-	1,18	0,02
FUR	16,76	2-pentylfuran	-	-	tr	tr

GR	TR	compuesto	Royal glory		Elegant lady	
			media	desv std	media	desv std
EST	5,08	methyacetate			-	-
EST	5,80	ethylacetate	-	-	0,63	0,02
EST	7,99	propylacetate			-	-
EST	8,33	methylbutanoate			-	-
EST	9,30	methyl 3-methylbutanoate			-	-
EST	9,83	ethylbutanoate			-	-
EST	10,90	ethyl 3-methylbutanoate	tr	tr	-	-
EST	11,08	butylacetate	2,80	0,26	5,72	0,54
EST	12,83	3-methyl-1-butylacetate	0,78	0,22	3,40	0,70
EST	14,67	pentylacetate	tr	tr	1,14	0,44
EST	15,13	methylhexanoate			-	-
EST	16,27	butylbutanoate	1,10	0,39	-	-
EST	16,80	ethylhexanoate			-	-
EST	17,34	buthyl 3-methylbutanoate	-	-	tr	tr
EST	18,25	hexylacetate	1,26	0,14	1,85	0,62
EST	18,74	methylheptanoate			-	-
EST	18,98	3-methylbutyl 2-methylbutanoate	-	-	-	-
EST	19,86	(Z)-3-Hexenyl Acetate	-	-	tr	tr
EST	20,33	ethylheptanoate			-	-
EST	20,43	(E)-2-Hexenyl Acetate	-	-	-	-
EST	22,27	methyloctanoate	-	-	-	-
EST	22,99	butylhexanoate	2,43	0,68	tr	tr
EST	23,09	hexylbutanoate	0,99	0,32	-	-
EST	23,41	hexyl 2-methylbutanoate	tr	tr	-	-
EST	23,67	ethyloctanoate	2,81	0,50	-	-
EST	23,96	hexyl 3-methylbutanoate	-	-		
EST	24,91	ethyl-4-octanoate			-	-
EST	28,32	hexylhexanoate	0,78	0,17	-	-
EST	28,71	methyl-4-decynoate			-	-
EST	28,39	2-methylpropyloctanoate	0,58	0,04		
EST	29,60	ethyl-4-decynoate			-	-
EST	32,56	hexyloctanoate	tr	tr	-	-

	ausente durante toda la conservación
-	no detectado (<0,17 ng/kg fw)
tr	trazas (0,17< ng/kg fw<0,52)

Tabla 9: Emisión de compuestos volátiles (ng/kg de peso fresco) en el momento de la cosecha para cada variedad. Media y desviación estándar. Tamaño muestral n=3.

Siendo TRP: terpenos, EST: ésteres, AOH: alcoholes, ALC: alcanos, ARO: compuestos aromáticos, LAC: lactonas y CE: cetonas.

4.3.2. ESTUDIO 2A: EVOLUCIÓN CUANTITATIVA DEL PERFIL DE EMISIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN CADA VARIEDAD.

El perfil de emisión no se mantiene estático a lo largo de la conservación del fruto. Se observa una evolución cuantitativa más o menos marcada según la variedad (Fig. 24 y Tabla 10).

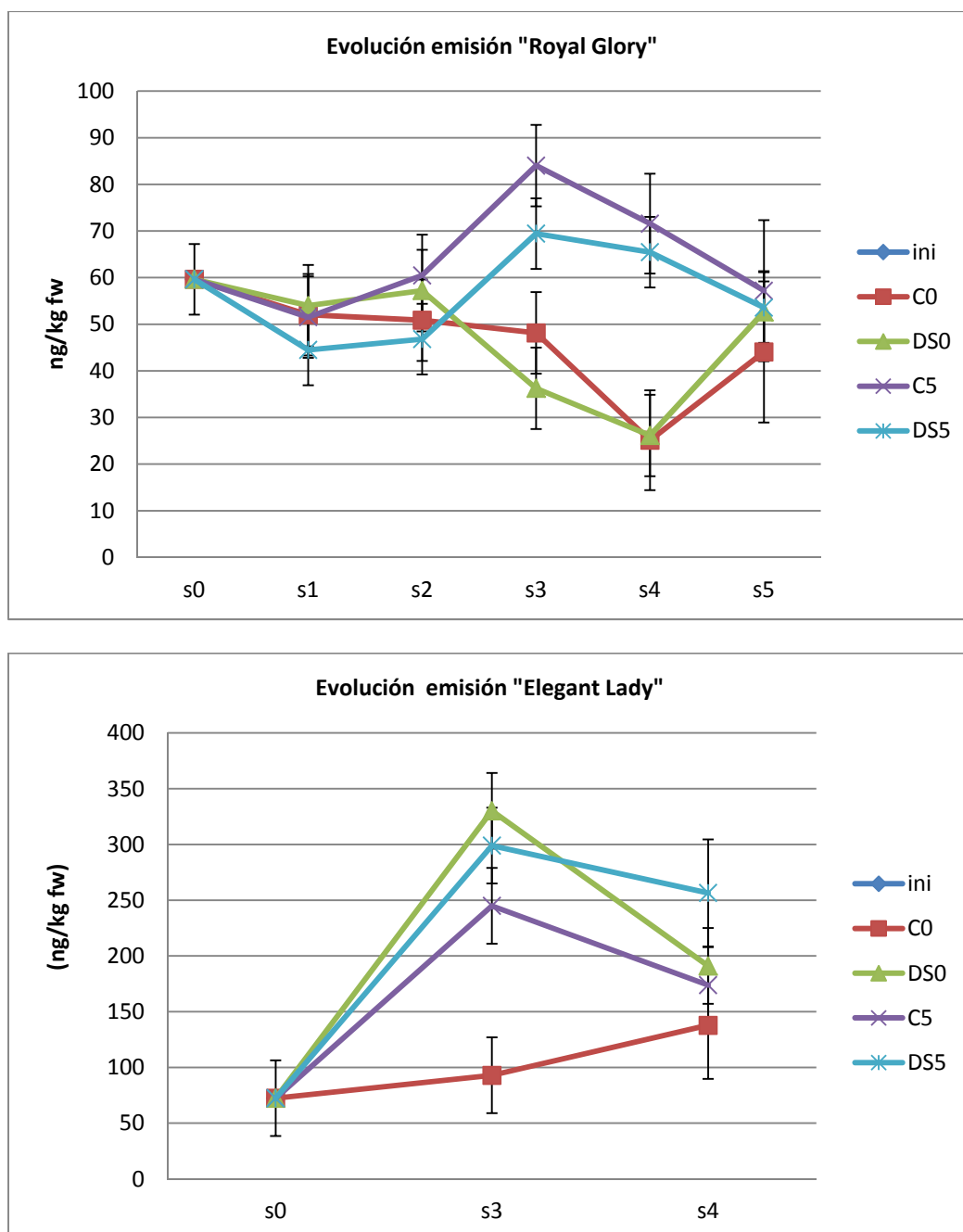


Figura 24: Evolución de la emisión para cada condición ensayada. Barras de error, error estándar (SE), tamaño muestral n=3

Royal Glory		C0		DS0		C5		DS5	
	s1	52,03	a	53,99	a	51,53	a	44,49	a
	s2	50,86	a	57,21	a	60,48	a	46,81	a
	s3	48,14	ab	36,25	a	84,03	c	69,44	bc
	s4	25,11	a	26,14	a	71,57	b	65,45	b
	s5	44,06	a	52,66	a	57,20	a	53,58	a
Elegant Lady		C0		DS0		C5		DS5	
	s3	92,97	a	330,21	b	244,92	b	298,96	b
	s4	137,82	a	191,02	a	173,86	a	256,52	a

Tabla 10: Medias semanales seguidas de distinta letra son significativamente distintas ($p < 0.05$; test LSD)

Generalmente la emisión de compuestos volátiles disminuye con largos periodos de almacenamiento frigorífico (Infante et al., 2009), esto es lo que se observa en “Royal Glory” en frutos conservados a 0°C. Sin embargo, coincidiendo con lo publicado por (Cano-Salazar et al., 2013) en “Early Rich”, en “Elegant Lady” no se da esta disminución y tras las 4 semanas de almacenamiento se observa incluso un incremento de emisión con respecto a los valores en cosecha, con valores superiores en los frutos sometidos a acondicionamiento térmico (Fig 24).

En ambas variedades se puede observar que a medida que incrementa el periodo de conservación frigorífica disminuyen las diferencias de emisión entre las distintas condiciones ensayadas. Resultados que coinciden con lo observado en “Early Rich” (Cano-Salazar et al., 2013) debido probablemente al comienzo de la senescencia.

4.3.4. ESTUDIO 2B: EVOLUCIÓN CUALITATIVA DEL PERFIL DE EMISIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN CADA VARIEDAD.

Se observa también una evolución cualitativa en el perfil de emisión de compuestos volátiles más o menos marcada según la variedad.

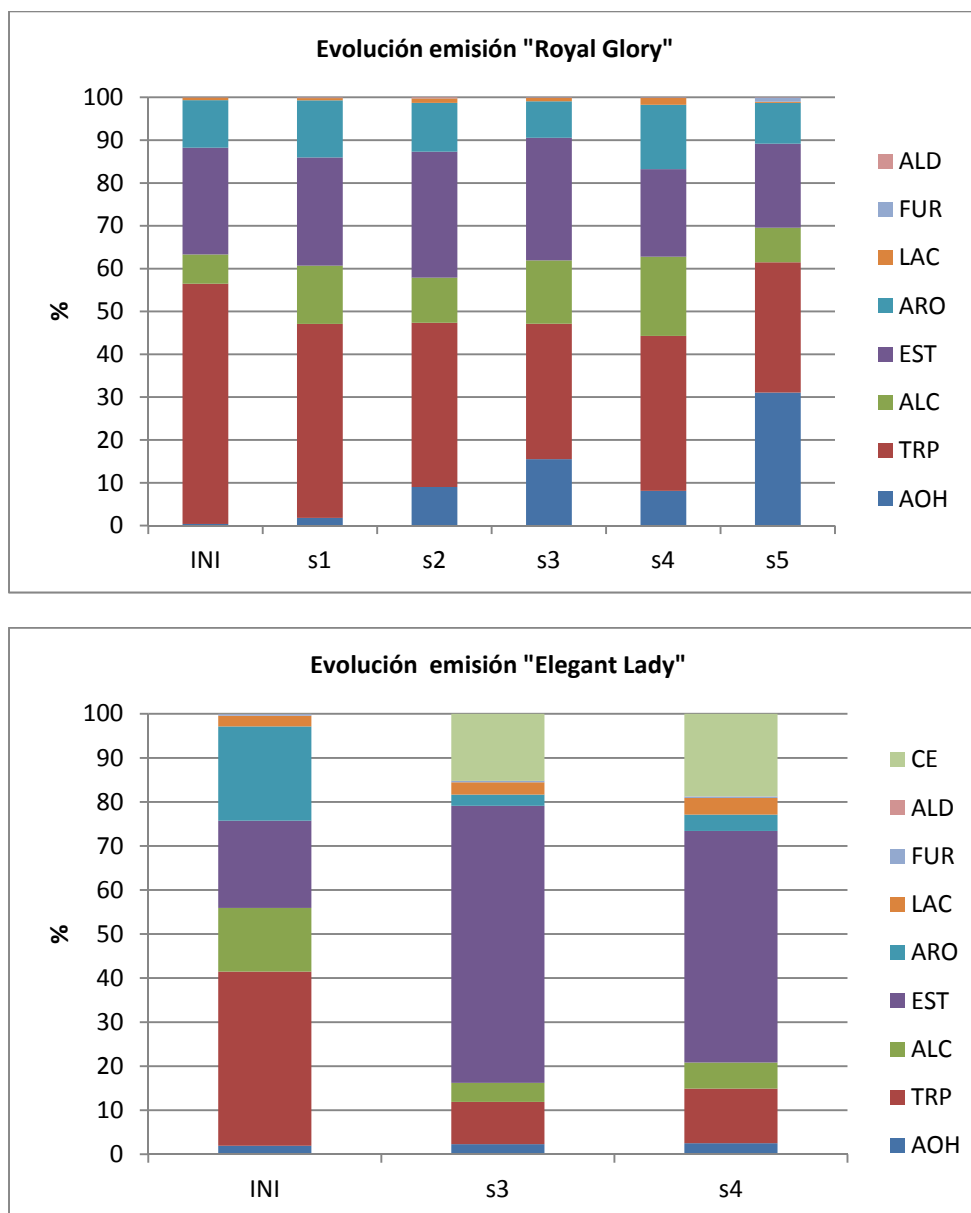


Figura 26: Evolución de la emisión de cada grupo químico Siendo TRP: terpenos, EST: ésteres, AOH: alcoholes, ALC: alcanos, ARO: compuestos aromáticos, LAC: lactonas y CE: cetonas.

En “Royal Glory”, el máximo de emisión se da entre la semana 2 (para las condiciones C0 y DS0) y la semana 3 (para C5 y DS5) (Fig. 24). A grandes rasgos la tendencia observada durante la conservación es: un incremento de alcoholes, alcanos y lactonas, un descenso de terpenos y la oscilación de ésteres y compuestos aromáticos (Fig. 26).

En “Elegant Lady”, el máximo de emisión para la mayoría de condiciones ensayadas se da en la semana 3 (DS0, C5 y DS5) (Fig. 24). Y la tendencia observada durante la conservación es: el incremento de ésteres, cetonas y lactonas, la disminución de terpenos, alcanos y compuestos aromáticos y el mantenimiento relativamente estable de alcoholes (Fig. 26).

Parece que “Elegant Lady”, a pesar de ser una variedad altamente sensible al daño por frío, presenta mayor variedad y cantidad de compuestos volátiles y una marcada evolución cuantitativa y cualitativa durante su conservación. Sin embargo, “Royal Glory”, parece ser una variedad más estable, con menor riqueza y cantidad de volátiles.

4.3.4. ESTUDIO 3: EFECTO DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN Y DEL TRATAMIENTO POSTCOSECHA EN LA EMISIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES.

4.3.4.1. ESTUDIO 3A: EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN Y DEL TRATAMIENTO EN LA EMISIÓN DE CADA GRUPO QUÍMICO DE COMPUESTOS VOLÁTILES

A simple vista se observa que el efecto del tratamiento de acondicionamiento térmico previo a la frigoconservación en la emisión de compuestos volátiles, es dependiente de la variedad, la temperatura de conservación y el periodo de almacenamiento frigorífico (Fig. 24). Se pasa ahora a analizar los resultados para cada grupo químico a lo largo del tiempo en cada condición ensayada.

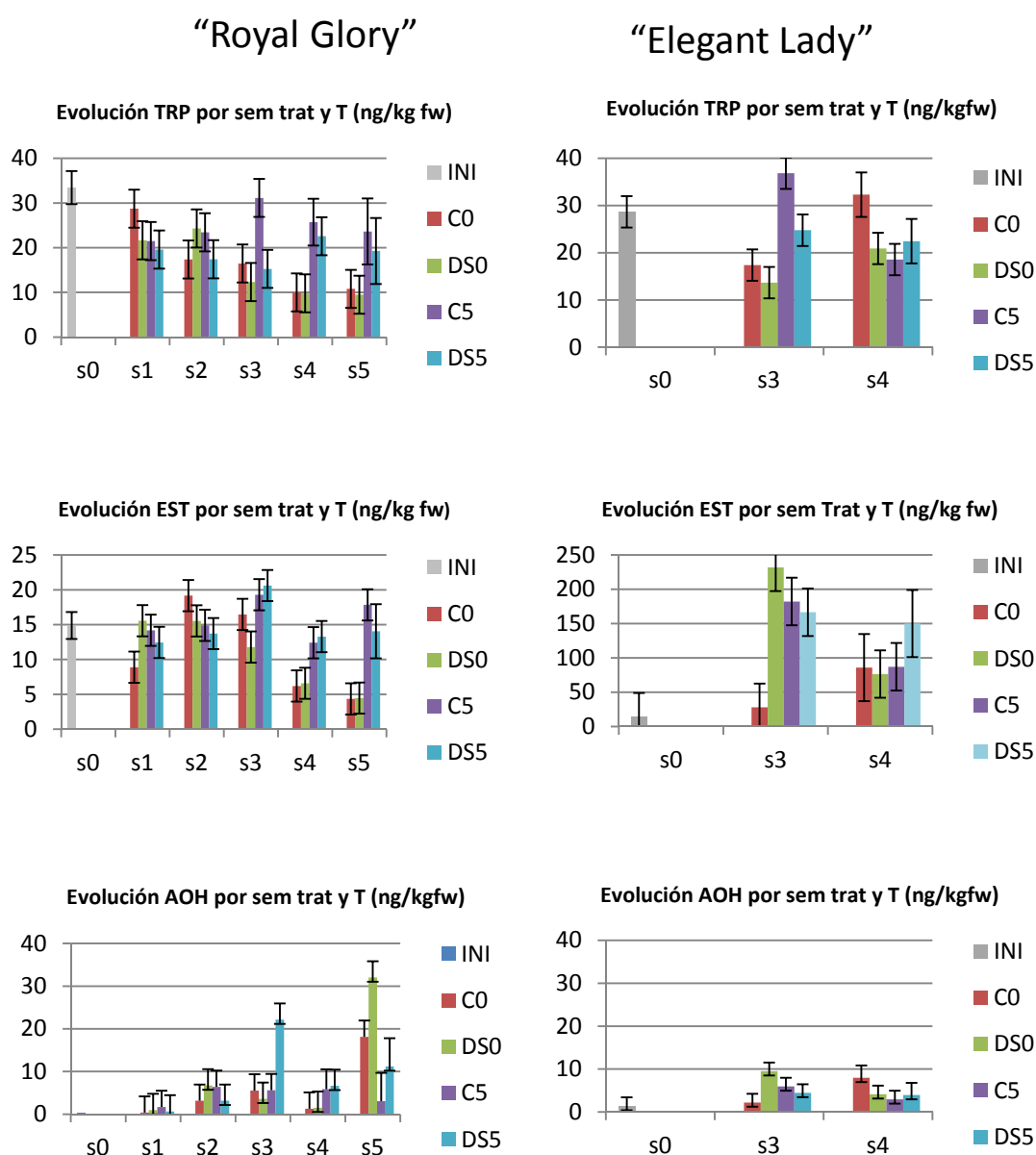
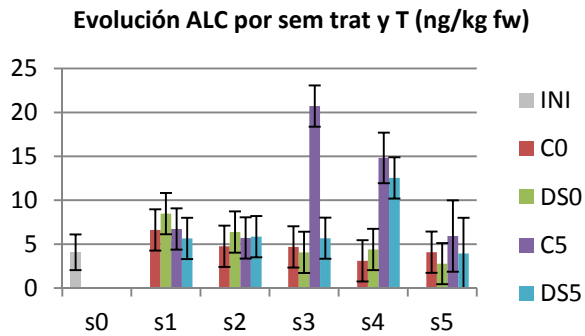


Figura 27: Evolución de la emisión de cada grupo químico en cada condición ensayada y variedad. Barras de error, SE. Siendo TRP: terpenos, EST: ésteres y AOH: alcoholes.

“Royal Glory”



“Elegant Lady”

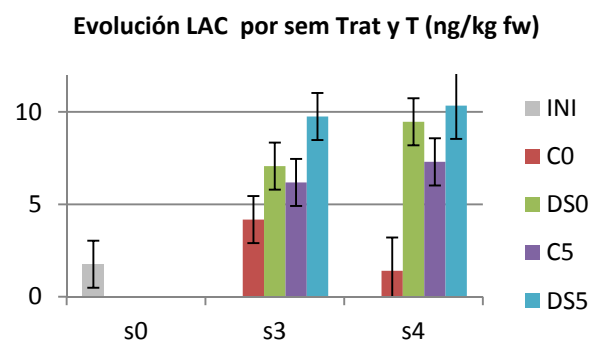
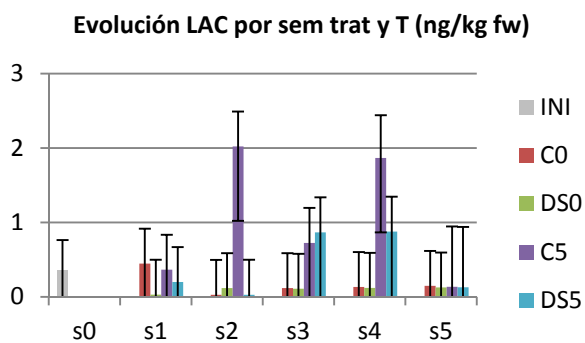
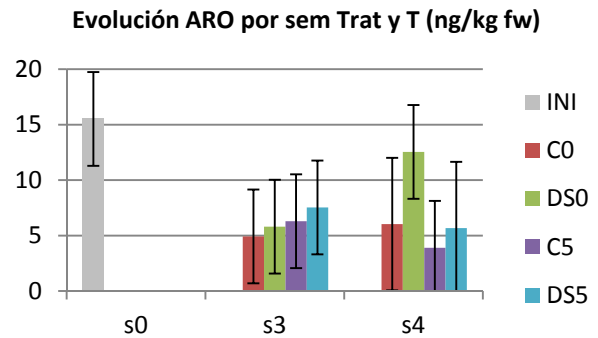
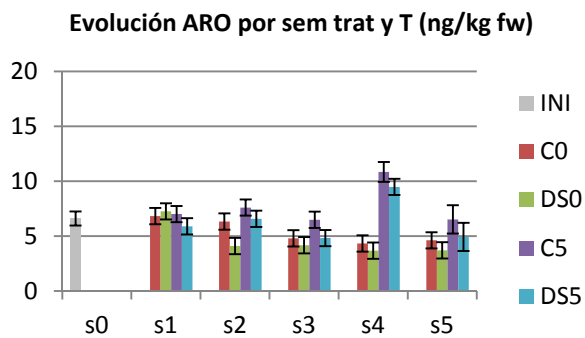
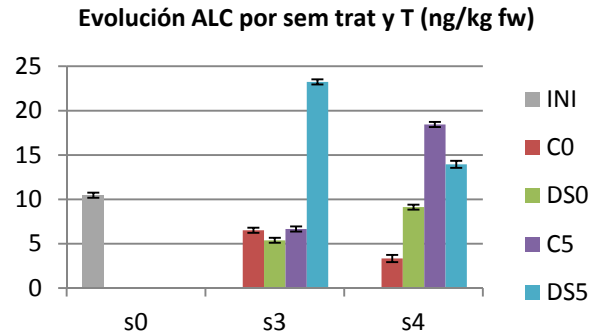


Figura 28: Evolución de la emisión de cada grupo químico en cada condición ensayada y variedad.
Barras de error, SE. Siendo ALC: alcanos, ARO: compuestos aromáticos y LAC: lactonas.

“Elegant Lady”

Evolución CE por sem Trat y T (ng/kg fw)

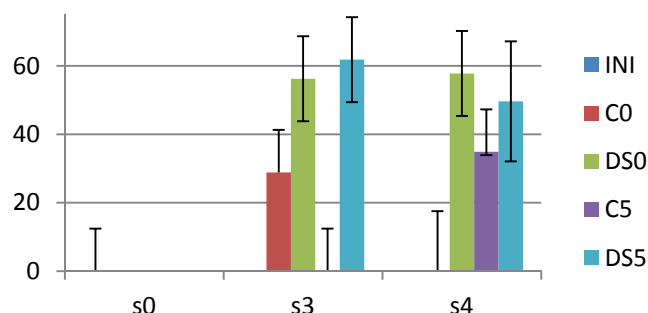


Figura 29: Evolución de la emisión de las cetonas en “Elegant Lady”. Barras de error, error estándar. Siendo CET: cetonas.

Royal Glory	s1								s2							
	C0	DS0	C5	DS5	C0	DS0	C5	DS5	C0	DS0	C5	DS5	C0	DS0	C5	DS5
EST	8,89	15,55	14,19	12,44	19,17	15,53	14,90	13,72	a	a	a	a	a	a	a	a
TRP	28,73	21,65	21,49	19,60	17,37	24,30	23,45	17,43	a	a	a	a	a	a	a	a
ALC	6,62	8,48	6,73	5,65	4,76	6,38	5,71	5,85	a	a	a	a	a	a	a	a
ARO	6,82	7,26	7,01	5,89	6,33	4,10	7,60	6,58	b	a	b	b	a	a	a	a
AOH	0,37	0,96	1,68	0,64	3,14	6,73	6,42	3,15	a	a	a	a	a	a	a	a
LAC	0,45	0,03	0,37	0,20	0,03	0,12	2,02	0,03	a	a	b	a	a	a	a	a
	s3								s4							
	C0	DS0	C5	DS5	C0	DS0	C5	DS5	C0	DS0	C5	DS5	C0	DS0	C5	DS5
EST	16,46	11,79	19,29	20,61	6,19	6,59	12,41	13,28	4,35	4,47	17,85	14,05	a	a	a	a
TRP	16,47	12,33	31,14	15,27	10,00	9,79	25,71	22,57	10,80	9,49	23,63	19,27	a	a	a	a
ALC	4,69	4,07	20,72	5,68	3,10	4,40	14,82	12,54	4,09	2,78	5,92	3,93	a	a	a	a
ARO	4,80	4,17	6,49	4,82	4,33	3,68	10,85	9,49	4,62	3,71	6,53	4,93	a	a	a	a
AOH	5,55	3,61	5,61	22,15	1,29	1,51	5,85	6,64	18,13	32,03	3,07	11,20	a	a	a	a
LAC	0,12	0,11	0,73	0,87	0,13	0,12	1,87	0,88	0,15	0,13	0,13	0,13	a	a	a	a
Elegant Lady	s3								s4							
	C0	DS0	C5	DS5	C0	DS0	C5	DS5	C0	DS0	C5	DS5	C0	DS0	C5	DS5
EST	28,04	231,81	182,19	166,55	85,84	76,51	87,10	149,95	a	a	a	a	a	a	a	a
CE	28,87	56,24	0,02	61,82	0,02	57,78	34,90	49,63	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
TRP	17,38	13,68	36,85	24,77	32,31	20,91	18,55	22,45	ab	ab	a	a	ab	ab	ab	ab
ALC	6,52	5,39	6,66	23,24	3,34	9,12	18,44	13,95	b	b	c	b	b	b	b	b
ARO	4,93	5,81	6,29	7,53	6,04	12,54	3,90	5,67	a	a	a	a	a	a	a	a
AOH	2,21	9,52	5,95	4,45	7,98	4,11	2,95	3,94	a	a	a	a	a	a	a	a
LAC	4,17	7,07	6,18	9,75	1,40	9,47	7,30	10,34	bc	bc	bc	bc	bc	bc	bc	bc

Tabla 11: Medias semanales seguidas de distinta letra son significativamente distintas ($p \leq 0.05$; test LSD)

Se analiza ahora lo que ocurre con cada compuesto a lo largo del tiempo en cada condición ensayada.

4.3.4.2. ESTUDIO 3B: EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN Y DEL TRATAMIENTO EN LA EMISIÓN DE CADA COMPUESTO VOLÁTIL.

Tabla 12=(ANEXO 3-1; PDF): Emisión de volátiles (ng/kg fw) en “Elegant lady”, tras frigoconservación a 0 y 5°C, con (DS) y sin (C) retraso en el almacenamiento frigorífico. Medidas semanales más dos días a 20°C. Medias semanales seguidas de distinta letra son significativamente distintas (p≤0.05; test LSD). Siendo TRP: terpenos, EST: ésteres, AOH: alcoholes, ALC: alcanos, ARO: compuestos aromáticos, LAC: lactonas, CE: cetonas y s: semanas.

	GR	TR	compuesto	s0				s3				s4			
				INI	C 0	DS 0	C 5	DS 5	C 0	DS 0	C 5	DS 5	C 0	DS 0	C 5
1	EST	5,08	methylacetate	0,02	0,02	s	5,27	ab	11,813	b	22,75	c	0,02	s	9,56
2	EST	5,80	ethylacetate	0,63	4,21	s	116,72	c	94,38	bc	22,58	ab	57,59	s	24,13
3	EST	7,99	propylacetate	0,02	0,57	s	9,16	c	1,606	b	0,02	s	3,99	b	1,68
4	EST	8,33	methylbutanoate	0,02	0,03	s	0,30	b	0,01	s	0,63	c	0,02	s	0,02
5	EST	9,30	methyl 3-methylbutanoate	0,02	0,36	s	1,12	b	1,69	c	1,16	b	0,02	s	1,23
6	EST	9,83	ethylbutanoate	0,02	0,03	s	0,70	b	0,02	s	0,01	s	0,03	s	0,02
7	EST	10,90	ethyl 3-methylbutanoate	0,03	0,03	s	1,32	b	1,08	ab	0,05	s	3,81	b	0,29
8	EST	11,08	butylacetate	5,72	5,66	s	4,43	s	7,51	s	5,86	s	1,92	s	5,57
9	EST	12,83	3-methyl-1-butylacetate	3,40	6,21	ab	4,23	s	10,99	c	8,79	bc	3,44	s	3,35
10	EST	14,67	pentylacetate	1,14	1,45	s	3,34	s	1,89	s	1,17	s	0,91	s	1,60
11	EST	15,13	methylhexanoate	0,02	0,02	s	1,28	b	0,64	ab	1,98	c	0,03	s	0,87
12	EST	16,27	butylbutanoate	0,01	0,02	s	0,03	s	0,02	s	0,01	s	0,00	s	0,02
13	EST	16,80	ethylhexanoate	0,02	0,01	s	1,71	b	0,34	s	0,01	s	0,03	s	0,03
14	EST	17,34	butyl 3-methylbutanoate	0,39	0,02	s	0,02	s	0,02	s	0,03	s	0,02	s	0,03
15	EST	18,25	hexylacetate	1,85	2,43	s	6,06	c	4,89	b	4,66	s	3,26	s	7,04
16	EST	18,74	methylheptanoate	0,02	0,02	s	1,30	bc	0,94	ab	1,96	c	0,03	s	1,16
17	EST	18,98	3-methylbutyl 2-methylbutanoate	0,02	0,03	c	0,03	bc	0,02	s	0,02	ab	0,02	s	0,03
18	EST	19,86	(Z)-3-Hexenyl Acetate	0,34	0,75	s	4,41	b	6,78	c	19,91	b	0,03	s	1,72
19	EST	20,33	ethylheptanoate	0,02	0,02	s	1,85	b	0,02	s	0,02	s	0,38	s	0,02
20	EST	20,43	(E)-3-Hexenyl Acetate	0,02	0,47	s	1,72	b	3,09	c	2,70	bc	0,03	s	0,70
21	EST	22,27	methyloctanoate	0,02	4,46	s	27,45	b	21,25	b	49,93	c	1,31	s	17,73
22	EST	22,99	butylhexanoate	0,31	0,11	s	0,14	s	0,16	s	0,21	s	0,06	s	0,14
23	EST	23,09	hexylbutanoate	0,05	0,03	s	0,13	s	0,11	s	0,12	s	0,01	s	0,08
24	EST	23,41	hexyl 2-methylbutanoate	0,02	0,02	s	0,03	s	0,02	s	0,02	s	0,03	s	0,03
25	EST	23,67	ethyloctanoate	0,05	0,96	s	35,84	b	10,64	s	5,71	s	8,43	s	3,53
26	EST	24,91	ethyl-8-octanoate	0,02	0,03	s	0,45	s	1,11	s	0,02	s	0,02	s	0,03
27	EST	26,32	hexylhexanoate	0,08	0,03	s	0,07	s	0,12	s	0,04	s	0,03	s	0,17
28	EST	26,71	methyl-4-decynoate	0,02	0,01	s	1,18	ab	0,82	ab	1,97	b	0,33	s	0,47
29	EST	29,60	ethyl-4-decynoate	0,01	0,02	s	1,17	b	0,31	s	0,03	s	0,02	s	0,01
30	EST	32,56	hexyloctanoate	0,02	0,03	s	0,36	c	0,02	s	0,24	b	0,01	s	1,75
31	CE	4,95	acetone	0,01	28,87	ab	56,24	b	0,03	s	61,82	b	0,02	s	57,78
32	TRP	9,14	α-pinene	22,42	12,12	s	10,74	s	28,33	c	18,93	b	21,79	b	15,11
33	TRP	12,00	β-pinene	1,56	0,98	ab	0,49	s	2,10	b	1,18	ab	4,62	b	2,28
34	TRP	13,53	carene	0,37	1,00	s	0,61	s	3,17	b	1,77	s	2,74	s	1,46
35	TRP	14,14	α-phellandrene	0,02	0,67	b	0,03	s	0,16	b	0,35	c	0,70	b	0,03
36	TRP	15,38	di-limonene	4,29	2,61	s	1,81	s	3,10	s	2,54	s	2,42	s	2,02
37	ALC	8,44	decane	0,94	1,10	bc	0,71	s	1,38	c	1,05	b	1,48	b	1,20
38	ALC	15,27	dodecane	1,39	1,03	s	0,94	s	0,95	s	0,97	s	0,93	s	0,71
39	ALC	25,25	pentadecane	6,80	2,83	s	2,17	s	2,30	s	11,75	b	0,59	s	4,66
40	ALC	30,07	heptadecane	1,33	1,55	s	1,57	s	1,93	s	9,47	b	0,34	s	2,56
41	ARO	9,95	toluene	5,71	1,07	ab	0,55	s	1,36	b	1,02	s	1,65	b	1,06
42	ARO	13,44	1,3-dimethylbenzene	3,13	1,04	s	0,71	s	1,55	s	1,23	s	1,37	s	0,96
43	ARO	15,04	1,4-dimethylbenzene	0,89	0,33	s	2,55	b	0,39	s	0,43	s	0,45	s	0,22
44	ARO	17,76	styrene	1,97	1,06	s	1,08	s	1,01	s	2,91	s	0,82	s	0,65
45	ARO	18,09	o-cymene	0,42	0,61	b	0,24	s	0,57	b	0,85	c	0,57	c	0,39
46	ARO	18,55	trimethylbenzene	3,40	0,82	s	0,68	s	1,40	s	1,11	s	1,19	s	0,25
47	AOH	6,90	2-propanol	0,02	0,03	s	0,40	b	0,02	s	0,02	s	0,03	s	0,02
48	AOH	7,09	ethanol	0,02	0,02	s	4,88	b	3,26	ab	0,02	s	4,37	s	0,02
49	AOH	13,07	1-methoxy-2-propanol	0,03	0,02	s	0,25	s	0,01	s	0,02	s	1,08	b	0,02
50	AOH	13,66	1-butanol	0,81	1,11	s	1,51	s	1,08	s	1,45	s	0,95	s	1,62
51	AOH	15,93	3-methyl-1-butanol	0,03	0,02	s	0,66	c	0,35	b	0,35	b	1,13	b	0,02
52	AOH	22,81	2-hexen-1-ol	0,45	0,08	s	0,22	s	0,63	b	0,56	b	0,40	s	0,38
53	AOH	23,21	2-octanol	0,02	0,93	ab	1,60	b	0,02	s	2,03	b	0,03	s	2,04
54	LAC	30,79	γ-methylbutyrolactone	0,58	1,60	s	2,02	ab	2,62	bc	3,08	c	1,31	s	1,46
55	LAC	39,17	δ-decalactone	0,00	0,46	b	1,14	c	0,03	s	1,02	c	0,05	s	1,62
56	LAC	38,44	γ-decalactone	1,18	2,12	s	3,91	s	3,53	s	5,66	s	0,05	s	6,39
57	FUR	16,78	2-pentylfuran	0,25	0,83	s	0,66	s	0,76	s	0,83	s	0,89	s	0,56
58	ALD	11,4	hexanal	0,03	0,02	s	0,03	b	0,02	ab	0,02	ab	0,01	s	0,02

Tabla 13=(ANEXO 3-2; PDF): Emisión de volátiles (ng/kg fw) en “Royal glory”, tras frigoconservación a 0 y 5°C , con (DS) y sin (C) retraso en el almacenamiento frigorífico. Medidas semanales más un día a 20°C Medias semanales seguidas de distinta letra son significativamente distintas ($p \leq 0.05$; test LSD).

[illegible]

ÉSTERES

Los ésteres son los compuestos químicos responsables de los aromas frutales y florales. Elevadas concentraciones de ésteres le confieren al melocotón un agradable aroma (Sumitani et al., 1994). Los valores de este grupo en “Royal Glory” son diez veces inferiores a los observados en “Elegant lady”.

En “Royal Glory” los valores tienden a oscilar durante la conservación con respecto al valor en cosecha; incrementa las 3 primeras semanas (s) y disminuye las 2 últimas (Fig. 26). Se observa un efecto de la temperatura de conservación sobre la emisión de ésteres, siendo superiores a 5°C que a 0°C (Fig. 27 y Tabla 11).

En “Elegant Lady” los ésteres son los compuestos mayoritarios, coincidiendo con lo observado por (Wang et al., 2009). Tienden a incrementar durante la conservación con respecto al valor en cosecha, alcanzando el 63% en s3 el 53% en s4 (Fig 26). Resultados que coinciden con estudios previos (Cano-Salazar et al., 2012) donde se observó que, en cultivares ácidos, los ésteres tienden a predominar en el perfil de volátiles.

Se observa un efecto del tratamiento sobre la emisión de ésteres, siendo superiores en condiciones DS que en condiciones C (Fig 27 y Tabla 11):

-Incrementos significativos de etilacetato (s3), propilacetato (s3), metilbutanoato (s3), metil 3-metilbutanoato (s3y4), etilbutanoato (s3), etil 3-metilbutanoato (s3), metilhexanoato (s3y4), etilhexanoato (s3), hexilacetato (s3y4), metilheptanoato (s3), (Z)-3-Hexenil Acetato (s3y4), etilheptanoato (s3), (E)-2-Hexenil Acetato (s3), metiloctanoato (s3y4), etiloctanoato (s3), etil-4-decinoato (s3), hexiloctanoato (s3y4), 3-metilbutil 2-metilbutanoato (s4) en DS0 respecto a C0 (Tabla 12; ANEXO 3-1).

-Incrementos significativos de: metilacetato (s3y4), metilbutanoato (s3y4), metilhexanoato (s3y4), metilheptanoato (s3y4), (Z)-3-Hexenil Acetato (s3y4), metiloctanoato (s3y4), metil-4-decinoato (s3), etil-4-decinoato (s3) y (E)-2-Hexenil Acetato (s4) en DS5 respecto a C5 (Tabla 12; ANEXO 3-1).

Al igual que observaron Cano-Salazar et al., (2012) en la variedad “Sweet Dream”, el principal éster durante la conservación de “Elegant Lady” es el etil acetato. Sin embargo, la concentración de este éster está por debajo de su umbral olfativo (OTH del inglés *Odor Threshold* 13.500 µg/kg) con lo que no contribuirá al aroma. Este mismo estudio detectó en melocotón “Early Rich” una estrecha relación entre la aceptación del consumidor y elevados valores de etiloctanoato, butil hexanoato y propil acetato, compuestos también presentes en nuestro ensayo en ambas variedades, excepto el propil acetato, sólo en “Elegant Lady” pero con incrementos muy significativos en DS0 respecto a C0 en la s3. Lavilla et al. (2002) también

observaron la importancia de algunos esteres de acetato como es el caso del propil acetato en la maduración de la nectarina Big top.

TERPENOS

Los terpenos contribuyen al aroma característico del melocotón, confiriéndole las notas sensoriales cítricas (Engel et al., 1988).

En las 2 variedades tienden a disminuir durante la conservación con respecto al valor en cosecha (Fig. 26). Resultados similares se han observado en estudios previos (Cano-Salazar et al., 2012).

En “Royal Glory” los terpenos son los compuestos mayoritarios, alcanzando el 56% en cosecha (Fig. 27 y Tabla 11). Se observa un efecto de la temperatura de conservación sobre la emisión de terpenos siendo superiores los valores a 5°C con respecto a 0°C, especialmente en la semana 3 (C5) (Fig. 27 y Tabla 11). El linalol es uno de los principales terpenos encontrados en melocotones maduros (Hinterholzer & Schieberle, 1998; Cano-Salazar et al., 2012; Cano-Salazar et al., 2013). En este ensayo sólo está presente en “Royal Glory” y sólo es mayoritario en cosecha (Tabla 13; ANEXO 3-2).

En “Elegant Lady” también se observa un efecto de la temperatura de conservación sobre la emisión de terpenos siendo superiores los valores a 5°C con respecto a 0°C, especialmente en las semanas 4 y 5 y de forma más evidente en los frutos control (Fig. 27 y Tabla 11).

Según (Muccilli et al., 2009) los genes que codifican para la síntesis de terpenos se inducen por etileno, es por ello que se esperarían valores superiores en las condiciones de ensayo que adelantan dicha maduración, es decir, 5°C y DS. Sin embargo se observan valores máximos en las condiciones más desfavorables de conservación; en frutos C5. Esto lleva a pensar que su emisión en este caso pudiera estar relacionada con el desarrollo de daño por frío.

ALCOHOLES

En “Royal Glory” los alcoholes tienden a incrementar durante la conservación con respecto al valor en cosecha (Fig. 26), observándose el máximo a 5°C en la s3 y el máximo a 0°C en la s5 (Fig 27 y Tabla 11). No se observa un efecto claro del tratamiento. Se sabe que el (E)-2-hexenol es un buen indicador de madurez en cosecha en la variedad “Royal Glory” (Lavilla et al., 2002). En este ensayo presenta su máximo a la semana 2 en frutos conservados a 5°C y en la semana 3 en frutos conservados a 0°C.

En “Elegant Lady” los alcoholes se mantienen a niveles bajos y relativamente estables durante la conservación con respecto al valor en cosecha (Fig. 26). En general no se observa un efecto claro de la temperatura ni del tratamiento (Fig. 27 y Tabla 11). Sí se observan incrementos significativos de algunos alcoholes concretos en DS0 respecto a C0 en la semana 3: 2-propanol (s3), etanol (s3), 3-metil-1butanol (s3). E incrementos significativos de algunos alcoholes en DS5 respecto a C5: 2-octanol (s3). (Tabla 12; ANEXO 3-1)

Los alcoholes C6 aportan notas sensoriales verdes en la maduración del melocotón (Zhang et al.,2010a). En este ensayo se ha detectado en “Royal Glory” 2-etil-1-hexanol (con máximos en la semana2) y 2-hexen-1-ol (con máximos en la semana 3), en ambos casos a 5°C. En “Elegant lady” el 2-hexen-1-ol también está presente pero en concentraciones bastante inferiores.

ALCANOS

En “Royal Glory” los alcanos tienden a incrementar ligeramente durante la conservación (hasta la s4) con respecto al valor en cosecha (Tabla 9). No se observa un efecto general del tratamiento pero sí un efecto de la temperatura de conservación sobre la emisión de alcanos, siendo superiores en 5°C que en 0°C (Fig.28 y Tabla 11). Incrementos significativos de decano (s3y4), dodecano (s3y4) y heptadecano (s3y4) se observaron en frutos conservadas a 5°C respecto a 0°C (Tabla 13; ANEXO 3-2).

En “Elegant Lady” los alcanos tienden a disminuir ligeramente durante la conservación con respecto al valor en cosecha (Fig. 26). No se observa un efecto general del tratamiento pero sí de la temperatura de conservación sobre la emisión de alcanos en la s4, siendo superiores los valores de C5 con respecto a C0 (Fig. 28 y Tabla 11). Incrementos significativos de pentadecano y heptadecano se observan en la s4 en los frutos C5 con respecto a los frutos C0 (Tabla 12; ANEXO 3-1).

Se observa un incremento de alcanos, siempre asociado a las condiciones más desfavorables de conservación; temperatura de conservación de 5°C (para ambas variedades) y además en frutos sin tratar (en “Royal Glory”). Esto lleva a pensar que el incremento de alcanos podría estar relacionado con daños por frío.

COMPUESTOS AROMÁTICOS

En “Royal Glory”, los compuestos aromáticos tienden a oscilar durante la conservación con respecto al valor en cosecha (Fig. 26). No se observa un efecto general del tratamiento pero sí

un efecto de la temperatura de conservación sobre la emisión en la s4 (Fig. 28 y Tabla 11). Incrementos significativos en las emisiones de tolueno, 1,3-dimetilbenceno, 1,4-dimetilbenceno, estireno, o-cimeno, trimetilbenceno se observan en la s4 en frutos conservados a 5°C con respecto a frutos conservados a 0°C (Tabla 13; ANEXO 3-2).

En “Elegant Lady”, los compuestos aromáticos tienden a disminuir durante la conservación con respecto al valor en cosecha (Fig. 26). No se observa un efecto general de la temperatura de conservación ni del tratamiento (Fig. 28 y Tabla 11). Sólo la emisión de o-cimeno muestra un incremento significativo en frutos DS5 con respecto a frutos C5 (s3y4) (Tabla 12; ANEXO 3-1).

LACTONAS

Estudios previos consideraban a la combinación de terpenos y lactonas la responsable del característico aroma frutal en melocotones y nectarinas (Engel et al., 1988; Visai & Vanoli, 1997). Estudios posteriores consideran a las lactonas los compuestos volátiles que más contribuyen al aroma del melocotón (Zhang et al., 2010a).

Las concentraciones de γ -hexalactona, γ -decalactona y δ -decalactona son generalmente bajas en cosecha e incrementan durante la maduración (Zhang et al., 2010a). Proporciones bajas de estos compuestos también se han encontrado en estudios previos y en otras variedades (Wang et al., 2009; Aubert & Milhet, 2007; Ortiz et al., 2009; Ortiz et al., 2010; Cano-Salazar et al., 2012; Cano-Salazar et al., 2013). En unos casos la lactona más importante ha sido la γ -hexalactona (Cano-Salazar et al., 2012; Cano-Salazar et al., 2013) y en otros las γ y δ -decalactonas (Wang et al., 2009). En este ensayo ha sido la γ -decalactona para “Royal Glory” y para “Elegant Lady” las γ y δ -decalactonas y γ -etilbutirolactona. La composición y contenido en lactonas dependen en gran medida de la variedad (Wang et al., 2009).

En las 2 variedades, las lactonas están presentes a niveles bajos que incrementan ligeramente durante la conservación con respecto al valor en cosecha (Fig 26).

En “Royal Glory” se observa un efecto de la temperatura de conservación sobre la emisión de lactonas, siendo superiores a 5°C que a 0°C (Fig. 28 y Tabla 11). Incrementos significativos se observaron en γ -decalactona (s3y4) en frutos conservadas a 5°C respecto a 0°C (Tabla 13; ANEXO 3-2). Se sabe que la γ -decalactona es un buen indicador de madurez en cosecha en la variedad “Royal glory” (Lavilla et al., 2002).

En “Elegant Lady” se observa un efecto del tratamiento sobre la emisión de lactonas, siendo ésta superior en frutos sometidos a acondicionamiento térmico (Fig. 28 y Tabla 11).

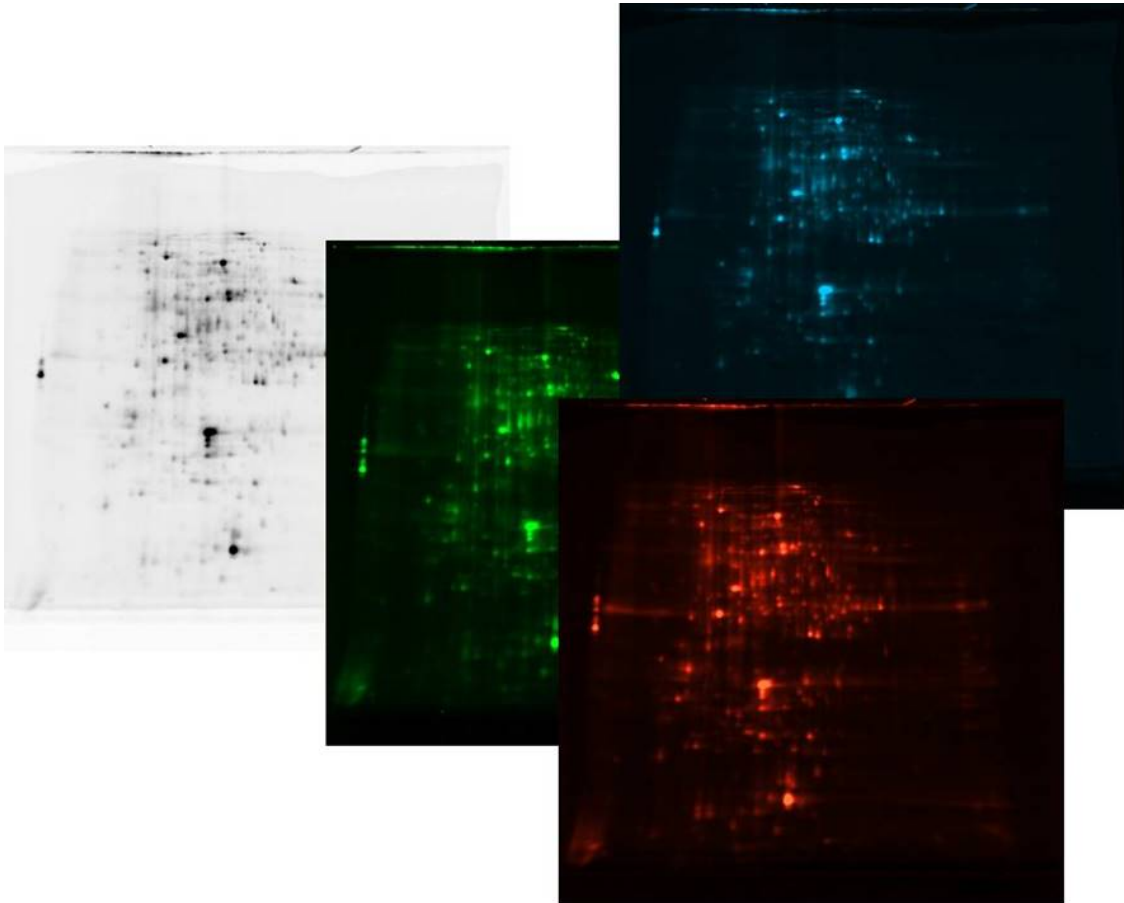
Incrementos significativos de δ -decalactona (s3y4) se observan en frutos DS0 respecto a frutos C0 y de γ -decalactona (s4) en frutos DS0 respecto a frutos C0. Y también se observan incrementos significativos de δ -decalactona (s3) en frutos DS5 respecto a frutos C5 (Tabla 12; ANEXO 3-1). En “Elegant Lady” también existe un efecto de la temperatura de conservación sobre la emisión de lactonas, siendo ésta superior en frutos conservados a 5°C (Fig. 28 y Tabla 11). Incrementos significativos de γ -etilbutirolactona (s3 y 4) se observan en frutos conservados a 5°C respecto a 0°C (Tabla 12; ANEXO 3-1).

CETONAS

Las cetonas pueden incrementar o disminuir con el almacenamiento frigorífico según la variedad (Cano-Salazar et al., 2012). Ellos detectaron incrementos de 2,3-butanodiona con la conservación frigorífica de “Royal Glory”. Este compuesto, dado el bajo OTH, contribuiría aportando unas notas sensoriales a mantequilla (Czerny et al., 2008). Sin embargo, en este ensayo no se ha detectado 2,3-butanodiona en ninguna de las dos variedades.

No se detectan cetonas en el perfil de compuestos volátiles de “Royal Glory” en cosecha ni durante la conservación en ninguna de las condiciones ensayadas.

En “Elegant Lady” las cetonas tienden a incrementar durante la conservación con respecto al valor en cosecha (Fig. 26) observándose un efecto del tratamiento sobre la emisión de dichos compuestos (Fig. 29 y Tabla 11), siendo superior la emisión en frutos DS que en frutos C. Se observan incrementos significativos de acetona (s3 y s4) en frutos DS0 respecto a frutos C0 y de acetona (s3) en frutos DS5 respecto a frutos C5 (Tabla 12; ANEXO 3-1).



BLOQUE 3:
ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO Y EXPRESIÓN PROTEICA

5. BLOQUE III:

ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO Y EXPRESIÓN PROTEICA

5.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado anteriormente, la conservación frigorífica es la principal tecnología utilizada para retrasar la maduración postcosecha de los frutos, ralentizar su deterioro y mantener su calidad y su valor nutricional, al reducir su tasa metabólica y respiratoria. Sin embargo muchos productos vegetales son susceptibles a las bajas temperaturas de conservación frigorífica, como es el caso del melocotón a temperatura entre 2 y 8°C, y desarrollan daños por frío (Lurie & Crisosto, 2005).

Conocer los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que tienen lugar en el desarrollo de este desorden es esencial para diseñar estrategias que prevengan o reduzcan el impacto y la sensibilidad a estos daños.

Los principales síntomas de este desorden a nivel tisular ya se trataron en el **bloque I**:

- Desordenes texturales
 - o disminución de la jugosidad de la pulpa acompañada de una textura que puede ser harinosa (“mealiness”), fibrosa (“woollynes”) o dura (leatheriness)
- Desordenes en la coloración
 - o oscurecimiento o pardeamiento de la pulpa
 - o intenso color rojo en la pulpa (“sangrado”) el cual generalmente se irradia desde la semilla.
 - o la pulpa se hace translúcida, generalmente desde la semilla hacia la periferia.

La pérdida de aroma, como síntoma común a todos los anteriores, ya se abordó en el **bloque II**.

Indagaremos sobre los síntomas de daño por frío a nivel celular/molecular en este **bloque III**.

5.1.1. SÍNTOMAS DE DAÑO POR FRÍO A NIVEL CELULAR

5.1.1.1. INTEGRIDAD DE LAS MEMBRANAS CELULARES

La fluidez de la membrana celular tiene la capacidad de regular la función de la misma a través de sus efectos sobre la disposición de proteínas integrales de membrana, la semi-permeabilidad y la actividad de transporte transmembrana (Los & Murata, 2004). Cuando disminuye la temperatura, las membranas celulares pasan de ser flexibles, líquido-cristalinas a adquirir una estructura de sólido-gel, lo que aumenta el riesgo de pérdida del control de la semi-permeabilidad (Lyons, 1973). La fluidez de la membrana, que depende en gran medida de las cadenas alquilo de los fosfolípidos, juega un papel crítico en la tolerancia al daño por frío en frutas y verduras (Zhang et al., 2010b).

El estrés por frío incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dan lugar a la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares (Sevillano et al., 2009), aumentando el grado de saturación de estos ácidos grasos, la degradación de los fosfolípidos y galactolípidos, y aumentando el ratio esteroles/fosfolípido que reduce la fluidez de la membrana. La peroxidación de lípidos se puede evaluar analizando el contenido en el producto final de la ruta metabólica; el malonil dialdehído (MDA) (Hodges et al., 1999). Hay una serie de enzimas responsables de la degradación de ácidos grasos insaturados, como el caso de la fosfolipasa D (PLD) y de la lipoxigenasa (LOX) (Pinhero et al., 1998). Por el contrario, las ácidos graso desaturasas (FADs) son un grupo de enzimas responsables del incremento del grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas (Hernández et al., 2011). Según Gutiérrez, (2015) los efectos principales de la peroxidación de los lípidos de membrana son dos; el daño estructural de la misma y la generación de productos secundarios. Si el tejido, órgano o planta entera está expuesta a temperaturas perjudiciales durante demasiado tiempo, las membranas celulares se rompen, provocando la pérdida intracelular de agua, iones y metabolitos (Sharom et al., 1994). La fuga de electrolitos es un parámetro eficaz para evaluar la permeabilidad de la membrana y por tanto la integridad de las mismas (Marangoni et al., 1996).

Además de la peroxidación de ácidos grasos insaturados, hay parámetros de energía metabólica que deben ser considerados, como el ATP y la carga energética de adenilato (AEC), ya que están relacionados con la biosíntesis de los ácidos grasos y con su grado de insaturación. La suma del total de ATP, ADP y AMP contenido en la célula es constante. La enzima adenilato quinasa interrelaciona con los tres componentes, posibilitando un equilibrio directo entre ellos ($ATP + AMP \rightarrow 2ADP$). La AEC expresa el estado en el que se encuentra el

adenilato celular; así, AEC=1 implica que todo el adenilato celular estará en forma de ATP y AEC=0 implica que el adenilato está en forma de AMP (Atkinson & Walton, 1967). La reducción de los niveles de energía metabólica (disminución de ATP, ADP y AEC y aumento de AMP) también puede afectar negativamente a la integridad de las membranas celulares (Brown & Beevers, 1987; Crawford & Braendle, 1996). Así, el tratamiento con ácido γ -aminobutírico (GABA) incrementa la resistencia de las membranas celulares al daño por frío en frutos de melocotón, manteniendo su integridad gracias al incremento en su poder antioxidante y al mantenimiento de altos niveles de ATP y AEC (Yang et al., 2011).

5.1.1.2. ORGANIZACIÓN DE LA PARED CELULAR

La pared de las células vegetales es gruesa y semirrígida, permite el paso de sustancias y no presenta transporte activo. En frutos, esta generalmente conformada por tres tipos de polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectina) y diversas glicoproteínas.

Las pectinas son heteropolisacáridos; una mezcla de polímeros ácidos (ácido D-galacturónico) y neutros (ramnosa, galactosa, arabinosa y otros) embebidos en una matriz gelatinosa hidratada y formando una estructura compleja altamente ramificada. Los residuos de ácido D-galacturónico están unidos entre sí por un enlace $\alpha(1\rightarrow4)$. Los grupos carboxilo del C6 (carbono número 6 del ac. galacturónico) pueden estar metil-esterificados o permanecer libres. Las características de la pared celular, tal como rigidez o relajación, dependen en gran medida del grado de metil esterificación de las pectinas (Salazar Iribe & Gamboa de Buen, 2013).

El *cambio drástico de textura* en variedades de melocotón de pulpa “melting” ha sido asociado con una solubilización masiva y depolimerización de las pectinas (Murayama et al., 2009). Dos enzimas juegan un papel importante en el dismantelamiento de la pared celular; primero la pectinmetilesterasa (PME), quitando el grupo metilo del ácido galacturónico y permitiendo la actuación posterior de la poligalacturonasa (PG) que degrada a las pectinas demetil esterificadas al hidrolizar el enlace α -1,4 del ácido galacturónico (Salazar Iribe & Gamboa de Buen, 2013). Las pectinas determinan la porosidad de la pared, y por tanto el grado de disponibilidad de los sustratos de las enzimas implicadas en las modificaciones de la misma.

Se ha demostrado que durante el almacenamiento frigorífico, en melocotones sensibles a daño por frío, incrementa la actividad de PME y disminuye la actividad de la Endo PG (Nilo et al., 2010). Y se ha sugerido que la presencia de estos polímeros largos no intervenidos por la

PG podrían estar envueltos en la *pérdida de jugosidad* característica de frutos sensibles (Lurie & Crisosto, 2005).

El cambio en la organización de la pared celular y el desmantelamiento de las membranas celulares, debido a estrés por frío, hace que los estímulos sean percibidos en el interior de la célula con mayor facilidad, ya que distintos compartimentos, antes estancos, ahora dejan de serlo. La desintegración de las membranas parece necesaria para poner en contacto enzimas y sustratos de algunos procesos (Zhang et al., 2010b).

5.1.1.3. EN OTROS COMPARTIMENTOS CELULARES

Otro de los síntomas de daño por frío es el *pardeamiento interno*. El daño por frío induce la expresión de la proteína antocianidina sintasa (ANS) o también llamada leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX); una de las cuatro dioxigenasas (DOX) de la ruta de biosíntesis de los flavonoides. La ANS es una proteína que transforma leucoantocianidina en antocianidina que es el sustrato de la síntesis de las antocianinas. Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. Estos compuestos pueden ser oxidados enzimáticamente por polifenol oxidasas (PPO) y peroxidasas (POD) dando lugar a una coloración marrón (Zhang et al., 2001; Zhang et al., 2005). La exposición a bajas temperaturas incrementa por tanto el sustrato de las enzimas PPO y/o POD en la pulpa del melocotón y con ello el pardeamiento interno (Ogundiwin et al., 2008a). Por otro lado, en estructuras celulares íntegras, la enzima PPO y los compuestos fenólicos están localizados normalmente en compartimentos separados (la PPO de plantas superiores en plastos y los compuestos fenólicos en las vacuolas); la desintegración de las membranas como consecuencia del daño por frío parece necesaria para ponerlos en contacto (Veltmann & Peppelenbos, 2003; Zhang et al., 2010b).

5.1.2. RESPUESTA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS POR FRÍO

Como organismos sésiles, las plantas han desarrollado la capacidad de responder a estímulos bióticos y abióticos del medio ambiente gracias a su plasticidad genómica, proteómica y metabolómica. Estos estímulos, en función de su intensidad, pueden suponer un estrés, al que las plantas deben responder para poder adaptarse. Los mecanismos de defensa de las plantas parten de la percepción de ese estrés y siguen con la activación de un conjunto de genes, la acumulación de sus respectivos transcritos y finalmente la síntesis y modificación postraduccional de proteínas de distinto tipo con lo que la planta es capaz de adquirir tolerancia a dicho estrés. Aunque el “sensor” de las plantas a las bajas temperaturas no ha sido identificado, los estudios de los últimos años continúan apuntando, entre otros factores, hacia una disminución en la fluidez de la membrana (Beck et al., 2007). Los mecanismos de respuesta de las plantas frente al estrés por frío son diversos, a continuación se describen algunos.

5.1.2.1. EL ESTRÉS POR FRÍO Y EL CALCIO

Se ha sugerido que el aumento de la viscosidad de la membrana afecta a los canales de Ca^{2+} , induciendo un aumento de la concentración de calcio citosólico (independientemente de la capacidad genotípica para la aclimatación al frío), el cual (en función del genotipo) sucesivamente activa una proteína quinasa (MAPK) u otras cascadas de transducción de señales amplificando la señal de Ca^{2+} que conduce a la expresión de genes *Cas* y al desarrollo de tolerancia al frío (Monroy & Dhindsa, 1995).

5.1.2.2. EL ESTRÉS POR FRÍO Y LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (**ROS**)

El frío incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen cambios en el estado de oxidación que incrementa la actividad de una serie de enzimas (Renaut et al., 2006):

Enzimas relacionadas con la fotosíntesis (ej. rubisco activasa y polipéptidos del fotosistema II)

Enzimas del metabolismo de carbohidratos (ej. UDP-glucosa pirofosforilasa, fosfoglicerato mutasa, sacarosa sintasa, sacarosa-fosfato sintasa, invertasa y enolasa)

Enzimas del metabolismo de la prolina (e.j. glutamina sintasa y prolina deshidrogenasa)

Enzimas del metabolismo de la lignina (e.j. ácido cafeico -O-metiltransferasa).

Enzimas de detoxificación: según Møller (2001), la respuesta de la planta puede consistir básicamente en dos opciones:

- Activando la expresión de genes que codifican para proteínas que impiden la producción de ROS, ej) oxidasa alternativa (AOX).
- Activando la expresión de genes que codifican para proteínas que detoxifican ROS como son las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GR, GPX, GST, APX, DHAR).

Trabajos recientes integran esta respuesta a nivel de membrana (Aghdam et al., 2013). Una alta proporción de ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados (AGI/AGS; unSFA/SFA), altos niveles de energía metabólica celular (ATP y AEC), un menor nivel de actividad de enzimas pro-oxidantes PLD y LOX y un mayor nivel de actividad de enzimas antioxidantes (AOX, SOD, CAT, GPX, GST, APX, DHAR y MDHAR) reducen el daño celular de membrana debido a una menor peroxidación lipídica de la misma y al impedimento de la acumulación de ROS. Todo ello tiene un efecto positivo en la tolerancia al daño por frío que se refleja en un mantenimiento óptimo de la integridad de la membrana celular (Fig. 33).

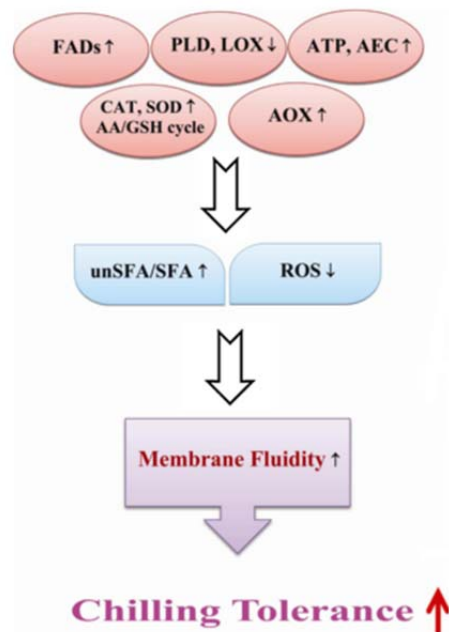


Fig. 33: combatir el estrés oxidativo para disminuir el daño por frío (Aghdam et al., 2013)

5.1.2.3. EL ESTRÉS POR FRÍO Y LOS CAMBIOS A NIVEL DEL PROTEOMA.

ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE LA PARED CELULAR (PME Y PG)

Las bajas temperaturas pueden inducir cambios en la actividad de enzimas hidrolíticas de la pared celular. Los frutos de melocotón resistentes a la conservación frigorífica, mantienen la capacidad de sintetizar o activar numerosas enzimas relacionadas con la hidrólisis de la pared celular al ser transferidos a 20°C, pero esta capacidad se altera en frutos que a baja temperatura desarrollan daños por frío de tipo harinosidad (“mealiness”). La fase avanzada de harinosidad se correlaciona con niveles bajos de endo-PG y altos niveles de actividad PME y con una reducción de la actividad del resto de enzimas implicadas en la hidrólisis de la pared celular (Brummell et al., 2004a; Brummell et al., 2004b; Nilo et al., 2010). Se ha sugerido que la presencia de estos polímeros largos no intervenidos por la PG podrían estar envueltos en la pérdida de jugosidad característica de frutos sensibles (Lurie & Crisosto, 2005).

PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA PATOGÉNESIS (PR)

Si bien entendemos las proteínas PR como aquellas proteínas codificadas por las plantas e inducidas ante situaciones patológicas o relacionadas con la patogénesis, muchas de ellas también pueden ser acumuladas bajo estrés abiótico. De los diecisiete grupos de proteínas PR en las que se clasifican (Fernandes et al., 2013), varios se inducen como respuesta al estrés por bajas temperaturas en cultivos y productos vegetales durante la frigoconservación:

PR-2 (β -1,3-glucanasas)

PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11 (quitinasas)

PR-5 (proteínas taumatina-like)

PR-10 (homólogos a Bet v-1)

PR-14 (proteínas transportadoras de lípidos)

Aunque su papel en muchos casos aún no está claro, se ha sugerido que podrían ser un componente de la vía de transducción de señales, desencadenadas durante la respuesta general a estrés (Renaut et al., 2006).

PROTEÍNAS HSP

Las proteínas de choque térmico (HSPs; del inglés *Small Heat Shock protein*) constituyen una familia de proteínas de respuesta a estrés cuyo peso molecular oscila entre 15 y 115 kDa. Se han identificado cinco familias de HSPs: Hsp70s, chaperoninas (HSP60s), HSP90s, HSP100s y HSP de bajo peso molecular (smHSPs) (Aghdam et al., 2013). Aunque las HSPs se caracterizaron por primera vez como respuesta a altas temperaturas, este no es el único estímulo que desencadena la biosíntesis de estas proteínas. En plantas, las bajas temperaturas (Renaut et

al., 2006; Nilo et al., 2010), el estrés oxidativo (Neta-Sharir et al., 2005) o los mecanismos de regulación de la maduración en fruta (Bianco et al., 2009) son algunos de los estímulos y/o procesos que inducen la acumulación de HSPs.

A menudo, la acumulación de las HSP confiere protección contra el estrés que provoca su biosíntesis y también frente a cualquier situación estresante posterior. La mitigación del daño por frío se podría atribuir a tres procesos principales (Aghdam et al., 2013):

(1) la actividad chaperona característica de esta familia de proteínas; que consiste en (i) el reconocimiento y la unión a proteínas desplegadas con el fin de completar su plegado correctamente, (ii) la prevención de la agregación de proteínas y (iii) la contribución a la renaturalización de proteínas agregadas.

(2) la acción de sHSPs como estabilizadores de las membranas celulares y

(3) la acción sinérgica de HSPs con sistemas antioxidantes.

DEHIDRINAS

Los genes COR (del inglés *cold-regulated*), codifican un conjunto de pequeñas proteínas hidrofílicas denominadas dehidrininas. Las dehidrininas son una subclase de proteínas LEA (del inglés *Late Embryogenesis Abundance*), estables al calor, ricas en glicina, inducidas por una amplia gama de estímulos (sequía, salinidad, baja temperatura, etc.) que dan lugar a estrés por deshidratación (Close, 1996; Close, 1997) y se han propuesto como estabilizadores de membranas celulares y como protectoras de otras proteínas de la desnaturalización cuando el contenido de agua celular se reduce (Allagulova et al., 2003). Esta familia de proteínas LEA se acumulan en respuesta a baja temperatura en plantas tanto herbáceas como leñosas (Wisniewski et al., 2004).

AFPS (PROTEÍNAS ANTICONGELANTES)

Las proteínas AFPs (del inglés *Antifreeze Proteins*) presentan un porcentaje de homología muy alto con PRs, en concreto con endoquitinasas de clase I, β -1,3-glucanasas y taumatina (Griffith & Yaish, 2004). Se ha demostrado que las AFPs se acumulan principalmente en el apoplasto bajo diferentes tipos de estrés, tales como frío, deshidratación y fotoperíodo de día corto. Su acumulación se ha asociado con un aumento de la tolerancia a la congelación de varias especies de plantas. Se ha demostrado que estas proteínas están implicadas en la reducción de la temperatura de congelación en hojas de plantas aclimatadas al frío y que cuando las hojas se congelan, inhiben la recristalización del hielo intercelular (Griffith et al.,

2005). Esto implica que las AFP podrían prevenir lesiones mecánicas en las células mediante la inhibición tanto del tamaño de los cristales de hielo individuales como del crecimiento de cristales a través de los espacios intercelulares.

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CBF y DREB1

Ambos factores de transcripción (TF) se unen a los motivos DRE (del inglés *Dehydration Responsive Element*), presente en los promotores de la mayoría de los genes de respuesta a frío (genes COR), como se ha descrito en *Arabidopsis thaliana* (Liu et al., 1998). Son reguladores críticos de la expresión génica en la señal de transducción de aclimatación al frío. Estos factores de transcripción han sido los primeros activadores transcripcionales en los que se ha demostrado su papel controlando la expresión de genes regulados por las bajas temperaturas (Thomashow, 1999).

LTP y ns-LTP

Las proteínas transportadoras de lípidos (LTP, del inglés *Lipid Transfer Protein*) son un grupo de proteínas altamente conservado en plantas superiores. Son responsables del traslado de fosfolípidos y otros ácidos grasos (poco solubles en agua) entre las membranas celulares. La frigoconservación de melocotón (21 días a 4°C) induce la expresión de genes que codifican para proteínas de transferencia de lípidos (LTP) (Pavez et al., 2013).

El frío también induce la expresión de genes que codifican para polipéptidos que presentan homología con proteínas transportadoras de lípidos (nsLTP, del inglés *non-specific Lipid Transfer Protein*). Experimentos con gramíneas demostraron una acumulación de estas proteínas cuando las plantas fueron expuestas a condiciones de estrés hídrico, salino o por frío (White et al., 1994).

ESPERMIDINA SINTASA

Plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresaban el gen de la espermidina sintasa de calabaza (SPDS) implicada en la síntesis de poliaminas, incrementaron el contenido en espermidina y resultaron ser más tolerantes al frío que las plantas wild type (Kasukabe et al., 2004).

5.1.2.4. EL ESTRÉS POR FRÍO Y SU REGULACIÓN HORMONAL

ETILENO

El incremento en etileno es una respuesta común de las plantas frente a distintos tipos de estrés, tales como las bajas temperaturas, sequía, heridas, irradiaciones, ozono y el ataque por patógenos (Yang & Hoffman, 1984).

Aunque el desarrollo de daño por frío se asocia a menudo con un incremento en la producción de etileno, cuando los frutos son transferidos a 20°C (demostrado en caquis, cítricos, peras, pepinos y calabazas) esto no es siempre así. Chirimoyas almacenadas a temperatura de daño por frío, no producen etileno al ser transferidas a 20°C o necesitan más tiempo del normal en alcanzar su máximo climatérico (Alque et al. 1994). La producción de etileno en nectarinas sanas, muestra un típico patrón climatérico, mientras que en nectarinas con daño severo, la tasa de producción de etileno disminuye. La severidad del daño está por tanto muy asociada a la inhibición en la evolución del etileno al transferir los frutos a 20°C en nectarina (Zhou et al. 2001). Igualmente se ha observado que la tasa de producción de etileno a 20°C después de conservación frigorífica se correlaciona negativamente con el desarrollo de harinosidad en melocotón (Giné-Bordonaba et al., 2016).

ÁCIDO ABCÍSICO Y ÁCIDO GIBERÉLICO

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que juega un papel crucial, no sólo en el desarrollo y la maduración de frutos, sino en la respuesta adaptativa frente al estrés biótico y abiótico (Leng et al., 2014). Se sintetiza en todas las partes de la planta con plastidios. Frente a distintos tipos de estrés, como son la sequía y el frío, las plantas incrementan la producción de ABA. Asimismo, la aplicación exógena de ABA incrementa la tolerancia a las bajas temperaturas en distintas especies vegetales. El ABA endógeno producido por manzanas almacenadas a bajas temperaturas podría estar asociado con la tolerancia de las mismas al estrés por bajas temperaturas (Yoshikawa et al., 2007).

Las giberelinas (GA3) son fitohormonas con efecto antagónico al etileno, retrasan por tanto los procesos de maduración. El aumento en la tolerancia a las bajas temperaturas se ha asociado con variaciones en GA3. El tratamiento precosecha de melocotón cv Chiripá con GA3, induce la expresión de genes relacionados con el metabolismo de pared celular, la biosíntesis de etileno y sHSP. Y al transferirse a 20°C después de la frigoconservación, los frutos tratados

incrementan la producción de etileno frente a los frutos control, lo que disminuye la incidencia de “woolliness” (Pegoraro et al., 2010).

ÁCIDO SALICÍLICO Y ÁCIDO JASMÓNICO

El ácido salicílico (SA) es capaz de inducir termotolerancia en plantas de mostaza (Dat et al., 1998a; Dat et al., 1998b), o proteger contra el estrés por frío plantas de maíz (Janda et al., 1999), tomate (Ding et al., 2002) y trigo (Taşgín et al., 2003). El SA podría estar jugando un papel esencial en la prevención el daño oxidativo. Uno de los modos de acción propuestos para el SA es la inhibición de la catalasa, una de las enzimas eliminadoras de H_2O_2 , de manera que las concentraciones celulares de H_2O_2 aumentarían y actuarían como mensajero secundario activando genes asociados a defensa (Chen et al., 1993). Shulaev et al., (1997) demostraron que el metilsalicilato (MeSA) podría actuar como una señal aérea que activaría la resistencia al daño y la expresión de genes asociados a defensa en plantas vecinas y en tejidos sanos de plantas infectadas. Tratamientos postcosecha con SA 1mM previos a la frigoconservación a 0°C disminuyeron los daños por frío en melocotón, probablemente debido a capacidad del SA para inducir los sistemas antioxidantes y la expresión de HSP (Wang et al., 2006).

Los jasmonatos son fitohormonas lipídicas, derivados oxigenados de los ácidos grasos linoleico y linolénico, principalmente, que actúan como moléculas señalizadoras de la respuesta de las plantas a numerosas situaciones de estrés y participan en diversos procesos de desarrollo (Lorenzo & Solano, 2005). El ácido jasmónico (JA) y su metil éster el metiljasmonato (Me JA) existen de forma natural en muchas plantas superiores (Meng et al., 2009). El JA podría estar asociado con la tolerancia a estrés por bajas temperaturas. En manzanas almacenadas a bajas temperaturas (-2°C), se observaron mayores concentraciones endógenas de JA que en las manzanas control mantenidas a 20°C (Yoshikawa et al., 2007). Y tratamientos postcosecha con MeJA previos a la frigoconservación a 0 y 5°C disminuyeron los daños por frío en melocotón debido probablemente al incremento de la actividad antioxidante (Jin et al., 2009; Meng et al., 2009).

5.1.2.5. EL ESTRÉS POR FRÍO Y OTROS COMPUESTOS ENDÓGENOS

POLIAMINAS

Las poliaminas son moléculas alifáticas nitrogenadas de bajo peso molecular con grupos aminos distribuidos de forma regular a lo largo de la estructura. Entre sus principales funciones destacan el empaquetamiento de ácidos nucleicos, la modulación de receptores de membrana y canales iónicos, la regulación de la expresión génica y la señalización celular (Guasco Herrera et al., 2014). También participan en la división celular, desarrollo de órganos, maduración, senescencia y en respuesta a diferentes estreses bióticos y abióticos (Bouchereau et al., 1999). Putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) son las poliaminas más abundantes en bacterias, plantas y animales. Los niveles de las poliaminas en los tejidos vegetales varían en respuesta al estrés hídrico (Wang & Steffens, 1985), osmótico (Tiburcio et al., 1990) y a las bajas temperaturas (Wang, 1987). Se piensa que su modo de acción frente al estrés y la senescencia puede ser debido a la capacidad para secuestrar radicales libres que se forman en la peroxidación de lípidos (Drolet et al., 1986).

La hipótesis de que la síntesis de poliaminas puede estar relacionada con la defensa de los tejidos vegetales al frío, está basada en la capacidad de estos compuestos para estabilizar las membranas celulares (Wang, 1987). En general, durante la exposición de frutos a bajas temperaturas, disminuyen los niveles de Spd y Spm y aumentan los niveles de Put (Serrano et al., 1996), al igual que en otros tipos de estrés (Bouchereau et al., 1999). La síntesis de ciertas poliaminas endógenas se puede ver incrementada por la aplicación exógena de las mismas, así como por el empleo de algunos tratamientos de acondicionamiento, lo que aumenta la tolerancia de los productos vegetales al frío. Así, en melocotones tratados con Put y almacenados a 2°C, aumenta la firmeza de los frutos y se reduce la susceptibilidad del fruto a ser dañado mecánicamente (Martínez-Romero et al., 2000).

AZÚCARES Y POLIALCOHOLES

La desecación que puede ocasionar el almacenamiento a bajas temperaturas se ha correlacionado con la acumulación de ciertos azúcares (tipo galactinol, trehalosa y fructano) y polialcoholes (como manitol y D-ononitol) (Bartels & Sunkar, 2005). Estos solutos juegan un papel importante en el ajuste osmótico de la célula y protegen estructuras macromoleculares contra el efecto desestabilizador de la congelación, el aumento en la tendencia a formar cristales en el citoplasma y la deshidratación (Guy et al., 2008), (Ruelland et al., 2009).

Plantas de *Arabidopsis* transgénicas que sobreexpresaron CBF3/DREB1A fueron tolerantes a estreses por sequía y frío (Avonce et al., 2004), y acumularon más galactinol y rafinosa que las plantas de tipo salvaje (Valliyodan & Nguyen, 2006).

El disacárido trehalosa se ha descrito como el azúcar con mayor capacidad estabilizadora en la protección de membranas y biomoléculas. Su efectividad se ha atribuido a varias de sus propiedades físico-químicas, tales como la sustitución de agua mediante el establecimiento de enlaces de hidrógeno con las membranas o la capacidad de modificar la capa de solvatación de las proteínas, protegiéndolas de la desnaturalización durante la deshidratación o las bajas temperaturas (Navarro et al., 2015) .

5.1.3. PROTEÓMICA

El proteoma es el conjunto de proteínas que un organismo sintetiza a partir de los genes que contiene (Wilkins et al., 1996). Es dinámico y múltiple; varía con el tipo de célula, con el tiempo y con el ambiente.

La proteómica es el estudio sistemático y a gran escala de las proteínas; su estructura, localización, función, interacciones y modificaciones (James, 1997). Existen por tanto distintos tipos de estudios proteómicos:

- Proteómica de expresión diferencial: estudio comparativo de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable.
- Proteómica estructural: estudio de la localización subcelular de las proteínas y caracterización de las interacciones proteína-proteína.
- Proteómica funcional: estudio y caracterización de un grupo de proteínas.

Las técnicas que emplea básicamente la proteómica son: la electroforesis, la cromatografía, la espectrometría de masas y la bioinformática

La proteómica es una ciencia relativamente reciente. Para su despegue definitivo ha sido necesario:

- El desarrollo previo de la genómica que permitió la secuenciación de genomas completos y el crecimiento exponencial en el número de entradas correspondientes a genes y/o proteínas en las bases de datos.
- Y la consolidación definitiva de la espectrometría de masas como técnica aplicada al análisis de moléculas biológicas.

El análisis transcriptómico del proceso de maduración del melocotón ha contribuido a mejorar el entendimiento de la regulación génica durante la fase climatérica (Trainotti et al., 2006). Sin embargo, se ha demostrado que no hay una relación unívoca entre la transcriptómica y la proteómica, debido fundamentalmente a la abundancia de modificaciones post-transduccionales (fosforilaciones, glucosilaciones, ubiquitinaciones, etc), que resultan fundamentales para la regulación de la función proteica (Cánovas et al., 2004)

La proteómica de tejidos vegetales, comparada con la genómica y la transcriptómica, está aún poco desarrollada, aunque avanza notablemente gracias a mejoras en la capacidad de extracción y separación de proteínas y en las técnicas de identificación mediante espectrometría de masas. El material vegetal se caracteriza por baja concentración de proteína: salvo algunas semillas, que rondan el 20% en proteína, los tejidos clorofílicos contienen alrededor del 3% y sólo el 1% en frutas.

En base al tipo de abordaje que se lleve a cabo en un estudio se puede hablar de:

- Proteómica de primera generación.
Se trata de un abordaje clásico en el que la separación se hace mediante electroforesis, la digestión es en gel y la identificación mediante huella peptídica y/o fragmentación de péptidos.
- Proteómica de segunda generación.
Se trata de un abordaje masivo en el que la separación se lleva a cabo mediante cromatografía líquida, la digestión es en solución y la identificación mediante fragmentación de péptidos a gran escala.

La experimentación que ha dado lugar a este trabajo se ha basado en un abordaje clásico (mediante electroforesis bidimensional tipo DIGE, digestión y espectrometría de masas) para llevar a cabo un estudio proteómico de expresión diferencial. La comparación sistemática del proteoma en diferentes situaciones metabólicas y/o patológicas permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estadios fisiológicos. En el caso del análisis proteómico asociado a patologías concretas, es posible identificar proteínas que permitirían diagnosticarlas o pronosticar la evolución de la misma. Dichas proteínas se conocen con el nombre genérico de biomarcadores.

La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) fue desarrollada por Patrick H. O'Farrell, quien exitosamente combinó dos métodos electroforéticos conocidos con el objetivo de resolver proteomas más complejos; el Isoelectroenfoque (IEE) y la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (O'Farrell, 1975).

En la primera dimensión o IEE, las proteínas migran en un gradiente de pH inmovilizado y se separan en función de su carga o punto isoeléctrico (pI). En la segunda dimensión o SDS-PAGE, las proteínas se separan en función de su tamaño o peso molecular (PM).

Cada uno de los “spots” visualizados en los geles 2D corresponde a una proteína diferente. Para mejorar la resolución, las proteínas deben estar completamente desnaturalizadas, reducidas, desagregadas de complejos proteicos y solubilizadas para romper interacciones macromoleculares (Chevalier, 2010).

La principal limitación de la electroforesis bidimensional en gel es su reproducibilidad. Esta se mejoró con el desarrollo de la tecnología DIGE (Electroforesis diferencial en gel) (Unlü et al., 1997). Consiste en una variación de la 2D-PAGE que permite analizar muestras diferentes en un único gel. Las muestras son marcadas con moléculas fluorescentes, mezcladas en una sola muestra conjunta (mix) y analizadas en un mismo gel (Fig. 34). El sistema DIGE además de mejorar la reproducibilidad, ha aumentado la sensibilidad y ha permitido la cuantificación de “spots” (Chevalier, 2010)

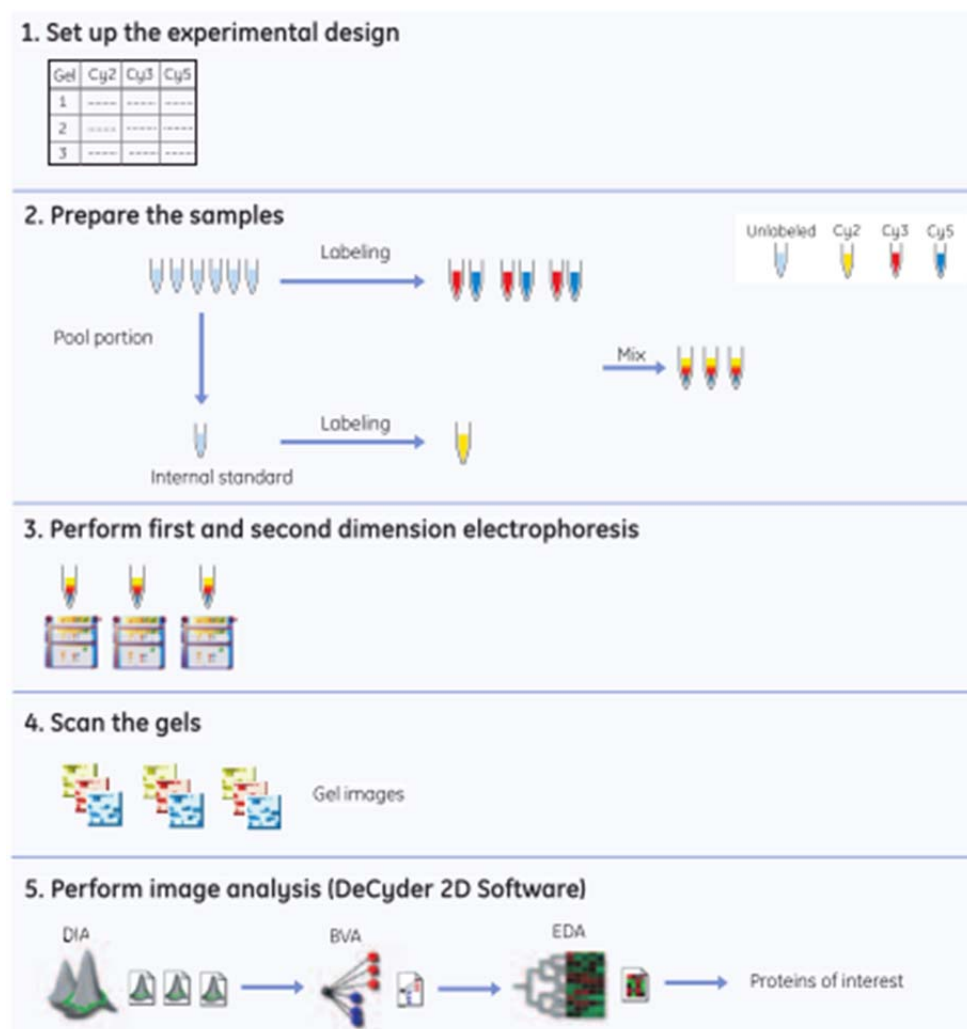


Figura 34: Flujo de trabajo analítico en el sistema DIGE.

1-Diseño. 2- Marcaje de muestras con fluoróforos Cydye. 3- Primera y segunda dimensión. 4- Escaneado de geles y 5-Análisis de imágenes.

La proteómica ha demostrado ser una poderosa herramienta en el estudio de la respuesta al estrés en plantas y mientras que la Biología del desarrollo ha recurrido a ella habitualmente, los trabajos en Fisiología de la post recolección no la han empleado con frecuencia, debido en parte a inconvenientes técnicos tales como el bajo contenido en proteínas de la fruta y la elevada presencia de moléculas interferentes (pigmentos, polisacáridos, ácidos orgánicos, polifenoles, etc.) (Chan, 2012) que deben ser eliminados durante el proceso de extracción.

Existen pocos estudios proteómicos sobre estrés por frío durante la postcosecha de melocotón (Obenland et al., 2008; Nilo et al., 2010) y sobre la aplicación de tratamientos de acondicionamiento térmico para aminorar el estrés por frío (C. Crisosto, 2004; Infante et al., 2009; Neves et al., 2013) pero hasta ahora no de forma combinada. Es por ello que abordaremos los siguientes objetivos en el Bloque III:

- Descripción del perfil proteico de la variedad más sensible al daño por frío en cada condición de conservación; **estudio proteómico de expresión diferencial.**
- Identificación de proteínas asociadas al daño por frío y a la termotolerancia; posibles **biomarcadores.**

El plan de trabajo para este bloque se basa en 5 estudios llevados a cabo con el material recolectado en la segunda campaña frutícola (variedades en negrita).

campana 1 (2007)	Ensayo 1 13/junio	Ensayo 2 23/julio	Ensayo 3 05/septiembre
MELOCOTÓN	Ruby Rich	Elegant Lady	Alejandro Dumas
	Royal Glory	Sum 67	
campana 2 (2008)	Ensayo 1 16/junio	Ensayo 2 15/julio	Ensayo 3 29/agosto
MELOCOTÓN	Royal Glory	Elegant Lady	Alejandro Dumas

Estudio 1. Estudio de expresión diferencial mediante DIGE.

Estudio2. Identificación de proteínas diferenciales mediante huella peptídica y fragmentación de péptidos.

Estudio 3. Análisis de categorías funcionales.

Estudio 4. Análisis de Cluster.

Estudio 5. Análisis del efecto de la temperatura de conservación frigorífica y del tratamiento postcosecha en la expresión proteica.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

La frigoconservación de “Elegant lady” se llevó a cabo con y sin la aplicación del protocolo de premaduración (DS y C) y a dos temperaturas distintas, 0°C y 5°C; tal y como se describió en el bloque 1.

El estudio proteómico de expresión diferencial que se abordará en este bloque compara cinco muestras de interés: una de ellas es el momento de cosecha (INI) y las otras cuatro son tras 4 semanas de frigoconservación más 2 días a 20°C (C0, DS0, C5, DS5), que es cuando esta variedad mostraba la mayor diferencia entre las condiciones de conservación según los parámetros estándar de calidad y su perfil de aromas y que además supone el momento de máxima expresión de daño por frío en las condiciones de conservación más desfavorables.

5.2.1. EXTRACCIÓN

El protocolo llevado a cabo para la extracción de proteínas totales se adaptó a melocotón a partir de trabajos anteriores (Hurkman & Tanaka, 1986; Carpentier et al., 2005; Faurobert et al., 2006; Isaacson et al., 2006).

La principal fuente de contaminación de la muestra en el análisis proteómico es la introducida por el propio investigador. Es por ello fundamental el empleo de guantes en todo momento, la utilización de un material reservado en exclusiva para esta técnica y su limpieza con detergentes específicos.

El otro problema de relevancia es la hidrólisis de las proteínas por enzimas o su desnaturalización por calor. La mejor forma de evitar la primera es trabajar en las primeras fases de la extracción con las gradillas de tubos inmersas en agua con hielo y la adición de inhibidores de proteasas en pasos específicos. La utilización del agitador tipo vortex debe realizarse en periodos cortos y manteniendo las muestras en agua con hielo entre ciclos de agitación.

El proceso de extracción se inició tomando 10 frutos de cada una de las 5 muestras, los cuales fueron pelados y su pulpa se trocó e inmediatamente se congeló en N₂ líquido para a continuación ser pulverizada en un molinillo mientras se mantenía congelada en todo momento, asegurando así una perfecta homogenización de la muestra. La muestra se conservó a -80°C hasta el momento del análisis.

La extracción se efectuó tomando 2g de cada muestra (pulverizada y conservada a -80°C), a los que se añadieron 2 mL de **tampón de extracción** (TRIS 100mM pH 9, EDTA 5 mM, DTT 20mM, 30% de sacarosa, KCl 100mM y PMSF 2mM).

Se aplica vortex durante 30", 5 veces/muestra sumergiendo el tubo en agua con hielo entre cada vez. Se añaden 3ml de fenol saturado en TRIS pH 8,8. Se aplica vortex 30", 2 veces/muestra. Se incuba 10min a 4°C. Se centrifuga 15min a 25.000g y 10°C. Se recoge la fase fenólica superior (contiene proteínas, lípidos y pigmentos) y se descarta la fase acuosa que contiene (azúcares, ácidos nucleicos y restos celulares insolubles). Se precipitan las proteínas con cinco volúmenes de acetato amónico 0,1M en metanol (o/n). Se centrifuga 10min a 10000g y 4°C. Se resuspende el pellet en 5ml de acetato amónico 0,1M en metanol. Se incuba 10min a -20°C. Se centrifuga 10min a 10000g y 4°C. Se resuspende el pellet en 1ml de acetona al 80%. Se incuba 10min a -20°C. Se centrifuga 10min a 10000g y 4°C. Se retira el sobrenadante. Se seca el pellet al aire 10min. Se resuspende el pellet en 500ul de **buffer de resuspensión** a pH 9 (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 2%, TRIS 10mM pH 9,5). De cada extracción se realizaron cuatro réplicas técnicas. A diferencia del 2D tradicional, en el 2D-DIGE no se añade anfolitos (pues son aminas primarias y compiten con las proteínas por los fluoróforos) ni DTT (ya que los grupos tioles producen un descenso de la eficiencia del marcaje) hasta después de que se ha realizado el marcaje.

5.2.2. CUANTIFICACIÓN

La concentración de proteínas de estas muestras se determinó mediante el "kit" comercial RC-DC Protein Assay (BIORAD). Se basa en un método colorimétrico y está diseñado para evitar la interferencia de agentes reductores (DTT) y de detergentes (CHAPS). El rango lineal para este kit es de 0 a 2mg/mL de proteínas y la absorbancia se mide a 750nm. La curva patrón se realizó con diluciones de Albúmina Sérica Bovina (BSA) a partir de una stock de 100 mg/mL. De cada una de ellas se utilizaron 25 µL.

5.2.3. MARCAJE CON FLUORÓFOROS DIGE

El marcaje de las proteínas se lleva a cabo con fluoróforos de cianina. Estos tienen un grupo éster reactivo y están diseñados para formar un enlace covalente con el grupo amino epsilon del residuo de lisina de la proteína.

Se denomina "marcaje mínimo" debido a que sólo el 1-2% de los residuos de lisina de la proteína son marcados. El pI de las proteínas marcadas no varía, ya que los fluoróforos

compensan la pérdida de carga positiva de los residuos de lisina. Sin embargo, el PM se incrementa en 434-464 Da por cada residuo de lisina marcado.

La sensibilidad de este marcaje es de hasta 25pg de proteína y tiene un rango lineal de hasta 5 órdenes de magnitud (la tinción con plata detecta entre 1 y 60 ng de proteína y su rango dinámico es de menos de 2 órdenes de magnitud).

Antes del marcaje es fundamental que el pH esté entre 8 y 9; si el pH es mayor, aumenta el marcaje inespecífico, si el pH es menor, disminuye la eficiencia del marcaje. Comprobar con 1µl en papel tornasol y si es necesario corregir con NaOH 50mM o superior. Los fluoróforos son moléculas sensibles a la luz, por lo que toda la parte experimental en la que intervienen debe realizarse en condiciones de baja luminosidad.

Es altamente recomendable el uso de un estándar interno, que es una mezcla de todas las réplicas que se van a comparar en el ensayo. Este estándar interno se incluye en todos los IEE, como si fuera una tercera réplica. Típicamente va marcado con el fluoróforo Cy2. Esto permite compensar las variaciones inter-geles (que es un problema típico de la 2D tradicional)

5.2.3.1.DISEÑO EXPERIMENTAL

Se comparan mediante DIGE las cinco condiciones seleccionadas:

A: ini; frutos tras la recolección.

B: C0; frutos tras 4 semanas de frigoconservación a 0°C más 2 días a 20°C, sin tratamiento.

C: C5; frutos tras 4 semanas de frigoconservación a 5°C más 2 días a 20°C, sin tratamiento.

D: DS0; frutos tras 4 semanas de frigoconservación a 0°C más 2 días a 20°C, con tratamiento.

E: DS5; frutos tras 4 semanas de frigoconservación a 5°C más 2 días a 20°C, con tratamiento.

Realizando cuatro réplicas de cada una de ellas

A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4	D1	D2	D3	D4	E1	E2	E3	E4
ini	ini	ini	ini	C0.	C0.	C0.	C0.	D0.	D0.	D0.	D0.	C5.	C5.	C5.	C5.	D5.	D5.	D5.	D5.
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

Se marcan las muestras con los fluoróforos según el siguiente diseño experimental:

	Cy3		Cy5		Cy2
tira/gel 1	A1	ini1	D2	C5.2	MIX
tira/gel 2	A2	ini2	E3	D5.3	MIX
tira/gel 3	B3	C0.3	E4	D5.4	MIX
tira/gel 4	B4	C0.4	A3	ini3	MIX
tira/gel 5	C1	D0.1	A4	ini4	MIX
tira/gel 6	C2	D0.2	B1	C0.1	MIX
tira/gel 7	D3	C5.3	B2	C0.2	MIX
tira/gel 8	D4	C5.4	C3	D0.3	MIX
tira/gel 9	E1	D5.1	C4	D0.4	MIX
tira/gel 10	E2	D5.2	D1	C5.1	MIX

En cada tira de IEE / Gel 2D se incluyeron dos tratamientos (cada uno marcado con un fluoróforo diferente) más el “Mix” de todos los tratamientos del ensayo (marcado con el fluoróforo Cy2). El diseño se realizó de forma que no coincidieran en un mismo gel dos réplicas del mismo tratamiento, para reforzar la potencia estadística de los resultados.

5.2.3.2. PREPARACIÓN DE LOS FLUORÓFOROS PARA UN MARCAJE MÍNIMO

Utilizamos los fluoróforos de GE: CyDye DIGE Fluor Cy2, Cy3, Cy5 minimal dye kit 25 nmol. Se descongelan los fluoróforos 5min a temperatura ambiente y se reconstituyen con dimetilformamida (DMF) para obtener una solución concentrada “stock”. La DMF debe encontrarse totalmente anhidra porque el agua la degrada a compuestos aminados.

Para preparar la solución stock de cada uno de los tres fluoróforos, se añaden 25 µL de DMF a cada vial de 25 nmoles de fluoróforo (para que quede a una concentración 1mM). Se aplica vortex 30” y spin 30”. Esta solución puede conservarse hasta 2-3 meses en oscuridad a -20°C.

La solución “stock” debe diluirse a una solución de trabajo de 0,4nmoles/µL utilizando DMF. Para ello se añaden 3 µL de DMF a cada 2 µL de solución “stock”. Se aplica vortex 30” y spin 30”. Esta solución será estable 1 semana a -20° en oscuridad.

Para la reacción de marcaje se recomienda la proporción de 50µg de proteína/0.4nmoles de fluoróforo (50µg de proteína/µL de solución de trabajo de fluoróforo).

En tubos eppendorf se añade el volumen necesario de cada réplica para tener 50 µg de proteína. Y en un tubo extra llamado “MIX” se añaden 25µg de cada una de las 20 réplicas del ensayo. A cada réplica se añade 1µL de la solución de trabajo de los fluoróforos (Cy3 o Cy5

según diseño) y al tubo MIX 10 μ L de la solución de trabajo del fluoróforo Cy2. Se aplica vortex 30", spin 30" y se deja reposar en hielo 30 min en oscuridad.

La reacción de marcaje se detiene por adicción de lisina (es el residuo por el que se une el fluoróforo a la proteína). Se añadir 1 μ L de Lisina 10 mM en cada tubo (en el tubo mix 10 μ L). Se aplica vortex 30", spin 30" y se deja reposar en hielo 10 min en oscuridad.

En resumen, para el marcaje de cada réplica y del tubo MIX:

tira/gel	Tubo 1	Tubo 2	Tubo Mix
Muestra	50 μ g prot (x μ L réplica 1)	50 μ g prot (x μ L réplica 2)	Σ 25 μ g prot /réplica (x μ L de cada réplica x20)
Fluoróforo	1 μ L Cy3 Solución de trabajo	1 μ L Cy5 Solución de trabajo	10 μ L Cy2 Solución de trabajo
Lisina 10mM	1 μ L	1 μ L	10 μ L

Las muestras ya marcadas con el fluoróforo pueden utilizarse en el momento o conservarse hasta 3 meses a -80°C.

5.2.4. PRIMERA DIMENSIÓN; ISOELECTROENFOQUE (IEE)

En este paso tiene lugar la separación de las proteínas en función de su pl.

El IEE se llevó a cabo utilizando tiras de gel en gradiente inmobilizado Immobiline DryStrip pH3-10, 13cm de GE. La solución de proteínas procedente de la extracción previa y marcada con los fluoróforos se cargó en estas tiras tal y como se detalla a continuación.

5.2.4.1. RE-HIDRATACIÓN DE LAS TIRAS Y CARGA DE LA MUESTRA SIMULTÁNEAS

Manteniendo las condiciones de oscuridad, se reúnen en un sólo tubo los tres marcajes correspondientes a cada tira/gel (según diseño) y se añade el Destreak-IPG 0,5% y el DTT 18mM.

tira/gel	Todo el contenido ya marcado en el paso anterior de:	Contenido marcado del tubo Mix:	
TUBO I	Tubo 1+Tubo2	+ 1/10 vol Mix	+ 210 μ L (DeStreak+IPG 0.5%) +DTT 18mM

Como buffer de rehidratación se utiliza DeStreak (GE) para reducir el efecto de “streaking” sobre todo en el rango de pH 7-11. Al DeStreak se le añade como anfolitos 0,5% de IPG buffer (GE) y DTT 18mM (este último justo antes de usarse). La suma de la muestra marcada y el buffer de rehidratación no debe superar los 250µL en el caso de nuestras tiras.

Se retira con las pinzas el plástico que cubre el gel de la tira de IEE. Se pone aproximadamente la mitad de este volumen en un carril de la bandeja de rehidratación y se coloca la tira de IEE con el gel hacia abajo. Se incuba aproximadamente 20min a temperatura ambiente (la solución irá entrando por capilaridad en el gel). Se retira la tira y se añade la otra mitad del volumen en el mismo carril. Se vuelve a colocar la tira con el gel hacia abajo. Se incuba aproximadamente 20min a temperatura ambiente. Se cubre con 2ml de aceite mineral para prevenir la evaporación, se tapa la bandeja e incuba o/n a 4°C.

Se retira el exceso de aceite mineral dejando escurrir la tira en vertical sobre un papel absorbente unos segundos. Se lava la tira con 3ml de buffer de rehidratación durante 10min en balancín (añadir al buffer previamente el DTT 18mM). Se coloca la tira boca arriba. Se drena el exceso de solución de la tira y se transfiere a la bandeja de IEE colocando el gel hacia arriba. Hay que tener cuidado con la orientación de la tira en la bandeja. Se coloca en los extremos de la tira un papel de filtro humedecido con aproximadamente 100-150µL de agua destilada. Se colocan los electrodos. Y se cubre el carril con aceite mineral (aproximadamente 4 ml/carril).

El IEE se llevó a cabo en el equipo (Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit; GE) utilizando las siguientes condiciones:

Temperatura 20°C; corriente máxima 50µA/tira (máximo 80 µA si hay muchas sales); programa

etapa	tipo	voltaje	tiempo	Σ tiempo	Vh
1	step	500V	60'	60'	500
2	grad	1000V	64'	124'	800
3	grad	8000V	150'	274'	11300
4	step	8000V	30'	304'	2000
Total				5h	15000

Si al final no se hubieran alcanzado al menos 14000 V/h, se carga otro protocolo de extensión mantenido a 8000 V. Se retiran las tiras y se guardan a -80°C.

5.2.5. SEGUNDA DIMENSIÓN: SDS-PAGE

En este paso tiene lugar la separación de las proteínas en función de su tamaño (PM).

También ha de llevarse a cabo en condiciones de baja luminosidad.

5.2.5.1. EQUILIBRADO

Después de la primera dimensión las proteínas contenidas en las tiras de IEF se reducen y alquilan antes de la electroforesis mediante un proceso de equilibrado a temperatura ambiente, en agitación (empleando un balancín o similar), con la cara del gel hacia abajo; 15min en buffer de equilibrado con 1%DTT (se reducen los puentes disulfuro) y 15min en buffer de equilibrado con 2,5%IAA (se alquilan/transfieren los grupos tioles libres).

Buffer de equilibrado: Urea 6M, Tris 7,5 mM pH 8,8 (ajustar con NaOH), Glicerol 29,3%, SDS 2% y trazas de azul de bromofenol.

5.2.5.2. SDS-PAGE

Las tiras de IEE una vez equilibradas se colocan sobre un gel de acrilamida al 12% y se cubren con agarosa fundida (1% agarosa, 1%SDS y trazas de azul de bromofenol) para llevar a cabo la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se utiliza para ellos cristales de 16*18cm y separadores de 1,5mm. Los cristales deben ser de baja fluorescencia para disminuir el fondo en el escaneo posterior de la imagen DIGE.

Geles:

	SEPARATING 12%
	1.5geles (45ml)
Acrilamida-bis (29:1) 40%	13.5 ml
LOWER 0.5M Tris HCl, pH6.8 +SDS 10%	11.7 ml
MQ	19.6 ml
APS 10%	225 µL
TEMED	22.5 µL
Vol tot	45 ml

Para evitar las interacciones de acrilamida no polimerizada con las proteínas, es aconsejable polimerizar los geles a temperatura ambiente un día antes de utilizarlos.

La electroforesis se lleva a cabo en cubeta modelo SE 660 Dual Cooled Vertical Unit, Basic (GE) refrigerada a 15°C con un baño modelo MultiTemp III Thermostatic Circulator 230 VAC (GE), utilizando las siguientes condiciones de campo eléctrico: 300V, 100mA y 16W (máximo 8W/gel), tiempo total aproximado 6h. Como tampón de electroforesis (10X) para su desarrollo utilizamos: glicina 192mM, SDS 0,1%, TRIS 25mM. pH 8,3 .

5.2.6. IMÁGENES DIGE

5.2.6.1. DIGITALIZACIÓN DE GELES

Después de la segunda dimensión, los geles son digitalizados utilizando un escáner de fluorescencia **PHAROX** (BIORAD) y el software **Quantity One**. El escaneo del gel se hace sobre uno de los cristales o incluso entre ambos cristales (si lo permite el equipo) siempre que los cristales sean de baja fluorescencia. El extremo ácido o anódico (+) se sitúa a la izquierda por convenio. La imagen obtenida se guarda en formato TIF y resolución 254 dpi 16bit, para ser analizada posteriormente.

5.2.6.2. ANÁLISIS DE IMÁGENES

Servicios solicitados al Centro de Asistencia a la Investigación de genómica y proteómica de la UCM

Se utilizó el software de análisis **DeCyder** v6.5 (GE) para detectar y cuantificar “spots” en las imágenes DIGE así como para comparar y analizar estadísticamente los geles de interés.

Las imágenes se importan a la base de datos de Oracle del software DeCyder. La co-detección de spots proteicos y la normalización de las imágenes se realiza en el módulo DIA (Diferencial In gel Analysis) del software donde se especifica que sean detectados el máximo número de “spots” posible. Las tres imágenes que corresponden a un gel DIGE (Cy3, Cy5 y Cy2) son analizadas conjuntamente en este módulo. A continuación se hace un filtrado de aquellos spots que corresponden a fondo y se eliminan aquellos cuyo volumen sea menor de 20.000 (volumen estimado del fondo para este ensayo). En todos los casos hubo que eliminar y/o incluir algún spot de forma manual. En total se detectaron **1429 spots**.

El emparejamiento de las manchas de todas las réplicas, se realiza en el módulo BVA (Biological Variation Analysis). Los datos obtenidos en el módulo DIA se utilizan en este nuevo

módulo, que tiene en cuenta las réplicas biológicas usadas en el proyecto. En primer lugar se definen los grupos que componen el experimento y en cada uno de ellos se incluye la imagen que corresponde a cada réplica, según el diseño experimental. Esta distribución queda reflejada en la (Tabla 14) (columna Group). La imagen del gel3, se utiliza como gel “Master”, sobre el que se realiza el emparejamiento de las manchas proteicas de todas las imágenes del ensayo. Tras realizar el emparejamiento de las manchas de forma automática, se repasa y/o modifica de forma manual aquellos emparejamientos que no se hubieran realizado correctamente. El número de manchas emparejadas en cada gel se resume en la (Tabla 14) (columna: Matched).

Image	DIA Ws Name	Label	No.of Spots	Matched	Function	Group
gel 1M2 con cristal LF Low 100 mm Cy2 254dpi 16bit.tif	gel1	Cy2	1214	872	A	Standard
gel 10 M2 con cristal LF Low 100 mm Cy2 254dpi 16bit.tif	gel10	Cy2	1122	871	A	Standard
gel 2M2 con cristal LF Low 100 mm Cy2 254dpi 16bit.tif	gel2	Cy2	1304	945	A	Standard
gel 3M2 con cristal LF Low 100 mm Cy2 254dpi 16bit.tif	gel3	Cy2	1429	1429	M, A	Standard
gel 4M2 con cristal LF Low 100 mm Cy2 254dpi 16bit.tif	gel4	Cy2	1318	1006	A	Standard
gel 5M2 con cristal LF Low 100 mm Cy2 254dpi 16bit.tif	gel5	Cy2	1328	974	A	Standard
gel 6M2 con cristal LF Low 100 mm Cy2 254dpi 16bit.tif	gel6	Cy2	1013	776	A	Standard
gel 7M2 con cristal LF Low 100 mm Cy2 254dpi 16bit.tif	gel7	Cy2	1225	928	A	Standard
gel 8M2 con cristal LF Low 100 mm Cy2 254dpi 16bit.tif	gel8	Cy2	1357	996	A	Standard
gel 9M2 con cristal LF Low 100 mm Cy2 254dpi 16bit.tif	gel9	Cy2	1195	924	A	Standard
gel 1M2 con cristal LF Low 100 mm Cy3 254dpi 16bit.tif	gel1	Cy3	1214	872	A	Ini
gel 2M2 con cristal LF Low 100 mm Cy3 254dpi 16bit.tif	gel2	Cy3	1304	945	A	Ini
gel 4M2 con cristal LF Low 100 mm Cy5 254dpi 16bit.tif	gel4	Cy5	1318	1006	A	Ini
gel 5M2 con cristal LF Low 100 mm Cy5 254dpi 16bit.tif	gel5	Cy5	1328	974	A	Ini
gel 10M2 con cristal LF Low 100 mm Cy3 254dpi 16bit.tif	gel10	Cy3	1122	871	A	D55
gel 2M2 con cristal LF Low 100 mm Cy5 254dpi 16bit.tif	gel2	Cy5	1304	945	A	D55
gel 3M2 con cristal LF Low 100 mm Cy5 254dpi 16bit.tif	gel3	Cy5	1429	1429	A	D55
gel 9M2 con cristal LF Low 100 mm Cy3 254dpi 16bit.tif	gel9	Cy3	1195	924	A	D55
gel 5M2 con cristal LF Low 100 mm Cy3 254dpi 16bit.tif	gel5	Cy3	1328	974	A	D50
gel 6M2 con cristal LF Low 100 mm Cy3 254dpi 16bit.tif	gel6	Cy3	1013	776	A	D50
gel 8M2 con cristal LF Low 100 mm Cy5 254dpi 16bit.tif	gel8	Cy5	1357	996	A	D50
gel 9M2 con cristal LF Low 100 mm Cy5 254dpi 16bit.tif	gel9	Cy5	1195	924	A	D50
gel 1M2 con cristal LF Low 100 mm Cy5 254dpi 16bit.tif	gel1	Cy5	1214	872	A	C5
gel 10M2 con cristal LF Low 100 mm Cy5 254dpi 16bit.tif	gel10	Cy5	1122	871	A	C5
gel 7M2 con cristal LF Low 100 mm Cy3 254dpi 16bit.tif	gel7	Cy3	1225	928	A	C5
gel 8M2 con cristal LF Low 100 mm Cy3 254dpi 16bit.tif	gel8	Cy3	1357	996	A	C5
gel 3M2 con cristal LF Low 100 mm Cy3 254dpi 16bit.tif	gel3	Cy3	1429	1429	A	C0
gel 4M2 con cristal LF Low 100 mm Cy3 254dpi 16bit.tif	gel4	Cy3	1318	1006	A	C0
gel 6M2 con cristal LF Low 100 mm Cy5 254dpi 16bit.tif	gel6	Cy5	1013	776	A	C0
gel 7M2 con cristal LF Low 100 mm Cy5 254dpi 16bit.tif	gel7	Cy5	1225	928	A	C0

Tabla 14: Spot Map Table, spots emparejados y distribución en los grupos experimentales.

El tratamiento estadístico de los datos, se realiza en el mismo módulo BVA. Tras este, se calcula la media de las réplicas de cada condición (Cy2, Cy3, Cy5) y la media del ratio de cada condición respecto al patrón interno (Cy3/Cy2 o Cy5/Cy2) de cada uno de los spots. Se realiza

la comparación entre condiciones de interés, calculando la relación entre las medias (average ratio) y el valor p del test t de Student no pareada (unpaired Student's t p valor), de cada uno de los spots. Para que una comparación se considere estadísticamente significativa el valor de p del test de ANOVA para ese spot debe ser menor de 0,05. De todos los spots que cumplen este criterio se seleccionan aquellos que en la prueba Student's t obtienen un p valor menor de 0,05, cuyo average ratio es $\geq \pm 1.5$ y que están presentes en al menos 8 de los 10 geles. El conjunto inicial de 1429 spots ha quedado reducido a 28 proteínas de interés (POI), cuyos datos están resumidos en las tablas de comparación de interés ([ANEXO4](#)) y su localización, en la imagen ([Fig. 38](#)).

5.2.6.3. ANÁLISIS PCA

Los datos generados por el análisis de las imágenes DIGE, se utilizan dentro del módulo EDA (Extended Data Analysis) del software DeCyder para hacer estudios estadísticos más complejos. El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica utilizada para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos. Intuitivamente la técnica sirve para determinar el número de factores subyacentes a un conjunto de datos, que expliquen la variabilidad de dichos datos.

5.2.7. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para la identificación de proteínas en gel por espectrometría de masas se necesita partir de spots lo más concentrados posibles, para lo cual generalmente no sirven los geles utilizados para DIGE y se debe realizar una nueva 2D con mayor cantidad de extracto proteico. Su posterior tinción nos permitirá localizar y extraer los spots del gel y digerir las proteínas para su análisis por espectrometría de masas.

5.2.7.1. GEL PREPARATIVO

Se llevó a cabo una electroforesis bidimensional estándar (no DIGE) en la que nuestra muestra fue un mix de las 5 muestras y sus cuatro réplicas. Se cargó un total de 250µg de proteína (el máximo indicado para las tiras de IEE de 13 cm). Las condiciones del IEE y de la segunda dimensión fueron idénticas a las empleadas en las electroforesis DIGE.

Tinción con Coomassie coloidal:

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas contenidas en los geles se fijan con una solución de etanol al 50% y ácido fosfórico al 2% en agua MQ durante 3h. A continuación, el

gel se lava tres veces con agua MQ (10 minutos/lavado) y posteriormente se incuba en la solución de tinción según la sensibilidad requerida, generalmente a temperatura ambiente o/n.

Solución de tinción (vol 500mL): disolver 85g sulfato amónico y 15mL ácido fosfórico en 330mL de agua MQ, añadir 160mL de metanol, agitar durante 1h. Disolver 330mg de Coomassie Blue G-250 en 10mL de metanol y añadir a la solución anterior.

Finalmente se destiñe con agua MQ en agitación hasta alcanzar el contraste adecuado.

5.2.7.2. DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas deben ser convertidas en péptidos, mediante proteólisis, con una proteasa específica de secuencia, generalmente la tripsina. Para ello, se cortan del gel preparativo los spots de interés (en este trabajo el proceso se realizó manualmente con una punta de pipeta pero también se habría podido hacer automáticamente con el equipo adecuado). Se destiñen los spot. Se reducen y alquilan las proteínas. Se deshidratan e hidratan e incuban o/n con tripsina para la digestión proteica. Mediante el uso de puntas de pipeta con columnas cromatográficas (zip tips) se concentra la muestra a la vez que se retira el exceso de sales procedente de los tampones.

5.2.7.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se selecciona como matriz ácido hidroxicinámico, que hace que el péptido procedente de la digestión se cargue positivamente. Se mezcla con la muestra (matriz en exceso), se coloca sobre una placa portamuestras para MALDI y se deja secar.

La matriz elegida es un ácido orgánico que se caracteriza por una elevada absorción a la longitud de onda del láser. Hace de disolvente de la muestra para formar una superficie sólida homogénea, con cierto grado de volatilidad para favorecer la desorción y con afinidad por los protones. Consecuentemente, la matriz separa las moléculas del analito para disminuir las interacciones intramoleculares y absorbe gran cantidad de energía haciendo pasar la matriz y el analito a fase gaseosa. La matriz es necesaria por tanto para la ionización del analito por transferencia de protones.

5.2.7.4. ANÁLISIS DE HUELLA PEPTÍDICA Y FRAGMENTACIÓN DE PÉPTIDOS

Servicios solicitados al Centro de Asistencia a la Investigación de genómica y proteómica de la UCM

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que consiste en la producción de iones en fase gaseosa a partir de moléculas y la posterior determinación de sus masas moleculares.

El resultado es una representación de la abundancia relativa de los iones producidos frente a su valor de masa/carga (m/z).

El espectrómetro de masas consta de:

- un sistema de entrada: en este estudio, una placa.

Y un sistema de alto vacío (para permitir el movimiento libre de los iones) donde se encuentra:
- una fuente de iones:
en este caso, MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
- un analizador:
en este estudio,
TOF (Time of Flight) para HUELLA PEPTÍDICA
Y MS/MS o TOF/TOF para FRAGMENTACIÓN DE PÉPTIDOS
- Y un detector:
En este caso 2 detectores en modo reflector para incrementar la resolución de los picos.

La ionización suave permite que moléculas grandes, polares y no volátiles se transformen en iones en fase gaseosa. Los iones se forman mediante pulsos de láser y se aceleran mediante la aplicación de un voltaje. Se mide el tiempo que tardan los iones en llegar al detector (los iones pequeños llegan antes que los grandes para una misma energía suministrada) y este nos da una relación (m/z).

Huella peptídica (Peptide Mass Fingerprinting; PMF) o mapeo peptídico: es el espectro de masas característico de cada proteína, obtenido al analizar la mezcla de péptidos obtenidos por digestión enzimática, utilizando un espectrómetro tipo MALDI-TOF.

Fragmentación de péptidos: es la secuencia total o parcial de aminoácidos de un péptido, que se obtiene utilizando un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) o (TOF/TOF).

5.2.7.5. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La identificación de las proteínas se realizó mediante la búsqueda combinada de la huella peptídica y de la fragmentación de péptidos contra las bases de datos: NCBI (con restricción taxonómica a *Viridiplantae*), TAIR 10 (*Arabidopsis thaliana*) y PHYTOZOME 11 (con restricción taxonómica a *Prunus persica*). Utilizando MACOT como motor de búsqueda.

El “protein score/ion score” es una puntuación que hace referencia a la probabilidad de que la coincidencia entre los péptidos o la fragmentación de estos y la proteína identificada sea meramente aleatoria. Sólo “score” superiores a 75 nos aseguran que dicha coincidencia no se debe exclusivamente al azar y por tanto son significativos.

5.2.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

La identificación mediante espectrometría de masas de los spots 2D genera un conjunto de datos. Partiendo de este conjunto de datos proteómicos ciertas herramientas bioinformáticas pueden facilitarnos la comprensión de procesos biológicos complejos. Por un lado, extrayendo del conjunto de datos la importancia de ciertas proteínas como biomarcadores y por otro, agrupando proteínas relacionadas entre sí (Eastwood Leung, 2012).

5.2.8.1. CLASIFICACIÓN ONTOLÓGICA; ANÁLISIS DE CATEGORÍAS FUNCIONALES (GO)

La era postgenómica ha traído un crecimiento exponencial de las bases de datos biológicas. En los últimos años, se ha comenzado a utilizar identificadores únicos para describir los componentes de estas bases de datos y la relación entre ellos. Estos identificadores únicos; términos representativos, ni ambiguos ni redundantes, son la base de la Ontología. La Ontología aporta una plataforma de comunicación entre investigadores y permite la observación y recuperación de datos de múltiples fuentes.

El conjunto de datos proteómicos pueden ser explorados y anotados mediante una solicitud de Gene Ontology (GO) y utilizados para elaborar una clasificación ontológica en base a tres categorías posibles; componentes celulares, procesos biológicos y función molecular.

En este estudio se han utilizados las plataformas GeneCodis (Carmona-Saez et al., 2007; Nogales-Cadenas et al., 2009; Tabas-Madrid et al., 2012), Virtual Plant (Katari et al., 2010) y Phytozome (Goodstein et al., 2012) para hacer una clasificación ontológica de las proteínas de interés tras su identificación por espectrometría de masas y previa búsqueda de homólogos en la base de datos de *Arabidopsis* (TAIR). La clasificación se hizo en base a la categoría “procesos biológicos”. También se ha utilizado la plataforma Quick GO (Gene Ontology) para realizar un mapa de procesos (*comparison chart*).

5.2.8.2. AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO (HIERARCHICAL CLUSTER)

El análisis de Cluster es una herramienta estadística y bioinformática que permite analizar y visualizar un conjunto de datos. Aunque fue diseñado inicialmente para estudios transcriptómicos, en los últimos años ha sido adaptado a estudios proteómicos. Este análisis permite agrupar proteínas según sus perfiles de expresión. El principio más importante de este análisis se basa en la distancia entre muestras, que puede calcularse mediante el coeficiente de correlación de Pearson o la distancia euclídea. Una vez calculada la matriz de distancias se aplica un algoritmo de transformación, los más usados son: linkage promedio, linkage completo o método de Ward's. El resultado final se representa en un dendrograma o “*heat map*” donde las columnas representan las muestras (geles) y las filas representan las proteínas de interés. En el dendrograma, las proteínas relacionadas aparecen en la misma rama (cuanto más corta es la rama que las une más estrecha es la relación entre ellas).

El objetivo final del análisis de cluster es localizar grupos de proteínas cuyo patrón de expresión sea similar, ya que esto puede ser indicativo de funciones biológicas relacionadas entre sí y asociadas a ciertos procesos biológicos de forma que estos cluster podrían servir para la diagnosis de dichos procesos (firmas proteicas)

En este estudio se ha utilizado el módulo EDA del software DeCyder para hacer Hierarchical Clustering Analysis (HCA) utilizando distancia euclídea y linkage promedio para el cálculo de distancias y su transformación.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. CUANTIFICACIÓN Y MARCAJE CON FLUORÓFOROS DIGE

Para cuantificar la concentración de proteína total extraída de cada muestra se interpola la absorbancia en la recta patrón de BSA ($y = 0,0023x + 0,0109$; $R^2 = 0,9943$). Los valores obtenidos para cada una de las réplicas se muestran en la segunda columna de la siguiente tabla. En función de esta concentración se calculan la cantidad de extracto de cada réplica a utilizar para el marcaje óptimo con fluoróforos DIGE. Los valores se muestran a continuación (Tabla 15).

		IEE NO DIGE	DIGE				preparativo			
	(µg/µL)	µL/tira IEF	µL	µL p MIX	µg		µL	µg	µL	µg
ini 1	6,61	37,8	7,6	3,8	25	ini1	1,89	12,5	3,78	25
ini 2	7,24	34,5	6,9	3,5	25	ini2	1,7 3	12,5	3,45	25
ini 3	6,18	40,4	8,1	4,0	25	ini3	2,02	12,5	4,04	25
ini 4	6,86	36,5	7,3	3,6	25	ini4	1,82	12,5	3,65	25
C0 1	5,72	43,7	8,7	4,4	25	B1	2,19	12,5	4,37	25
C0 2	7,16	34,9	7,0	3,5	25	B2	1,75	12,5	3,49	25
C0 3	6,48	38,6	7,7	3,9	25	B3	1,93	12,5	3,86	25
C0 4	6,59	37,9	7,6	3,8	25	B4	1,90	12,5	3,79	25
DS0 1	5,79	43,2	8,6	4,3	25	C1	2,16	12,5	4,32	25
DS0 2	6,46	38,7	7,7	3,9	25	C2	1,93	12,5	3,87	25
DS0 3	6,66	37,5	7,5	3,8	25	C3	1,88	12,5	3,75	25
DS0 4	6,42	39,0	7,8	3,9	25	C4	1,95	12,5	3,90	25
C5 1	6,48	38,6	7,7	3,9	25	D1	1,93	12,5	3,86	25
C5 2	6,46	38,7	7,7	3,9	25	D2	1,93	12,5	3,87	25
C5 3	6,73	37,2	7,4	3,7	25	D3	1,86	12,5	3,72	25
C5 4	5,63	44,4	8,9	4,4	25	D4	2,22	12,5	4,44	25
DS5 1	6,37	39,3	7,9	3,9	25	E1	1,96	12,5	3,93	25
DS5 2	6,42	38,97	7,8	3,897	25	E2	1,95	12,5	3,90	25
DS5 3	5,15	48,5	9,7	4,9	25	E3	2,43	12,5	4,85	25
DS5 4	5,75	43,4	8,7	4,3	25	E4	2,17	12,5	4,34	25
			µL	µL	µg		µL	µg	µL	µg
				99,0	500		39,6	250	79,2	500

Tabla 15: Resumen de la cuantificación de cada extracto proteico y las cantidades utilizadas para el marcaje DIGE en cada caso

5.3.2. ESTUDIO 1: ESTUDIO DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL MEDIANTE DIGE.

Se llevó a cabo una serie de comparaciones entre muestras de interés para nuestro ensayo, que nos permitieron definir un grupo de 28 proteínas de interés o diferenciales (POI). A continuación se resumen los datos de las POI; el resumen de las comparaciones de interés y el gel con la localización de los spots.

5.3.2.1. COMPARACIONES ENTRE CONDICIONES DE INTERÉS

Las comparaciones **C0/C5**, **DS0/DS5** y **C0, DS0/C5, DS5** no dan spot diferenciales significativos. Ver (ANEXO 4; PDF)

5.3.2.2. TABLA RESUMEN DE COMPARACIONES

En la [Tabla 16](#) se representa de forma esquemática los resultados obtenidos del análisis estadístico descrito en las comparaciones anteriores (ANEXO 4). Estas comparaciones nos permitirán más adelante contestar a una serie de preguntas en relación al posible efecto del tratamiento postcosecha, del tiempo y de la temperatura de conservación sobre la expresión de proteínas diferenciales concretas.

spot	conservación					tratamiento			temperatura		
	C0, C5, DS0,	C0, C5 / Ini	DS0, DS5 / Ini	C0, DS0 / Ini	C5, DS5 / Ini	DS0, DS5 /	DS0 / C0	DS5 / C5	C0, DS0 / C5, DS5	C0/C5	DS0/DS5
42	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
59	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
61	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
65	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
68	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
89	+	ns	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns
90	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
205	ns	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
216	+	+	+	+	+	-	-	-	ns	ns	ns
278	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
284	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
322	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
335	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
440	+	ns	+	ns	+	+	+	+	ns	ns	ns
555	ns	ns	ns	ns	ns	-	ns	ns	ns	ns	ns
600	ns	ns	+	ns	+	+	+	ns	ns	ns	ns
601	+	+	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns
631	+	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
671	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
835	ns	ns	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
891	+	+	+	+	+	+	ns	+	ns	ns	ns
943	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
981	+	+	+	+	+	+	+	+	ns	ns	ns
1093	+	ns	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1103	ns	ns	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1303	+	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns	ns
1312	+	+	+	+	+	+	+	+	ns	ns	ns
1345	+	ns	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 16: Resumen de las comparaciones de interés significativas entre las distintas condiciones ensayadas (En azul: las comparaciones de interés) ns: no diferencias significativas de expresión

+: expresión de la proteína en la condición del numerador>expresión en denominador

-: expresión de la proteína en la condición del numerador<expresión en denominador

5.3.2.3. LOCALIZACIÓN EN EL GEL DE LOS SPOTS DIFERENCIALES (POI)

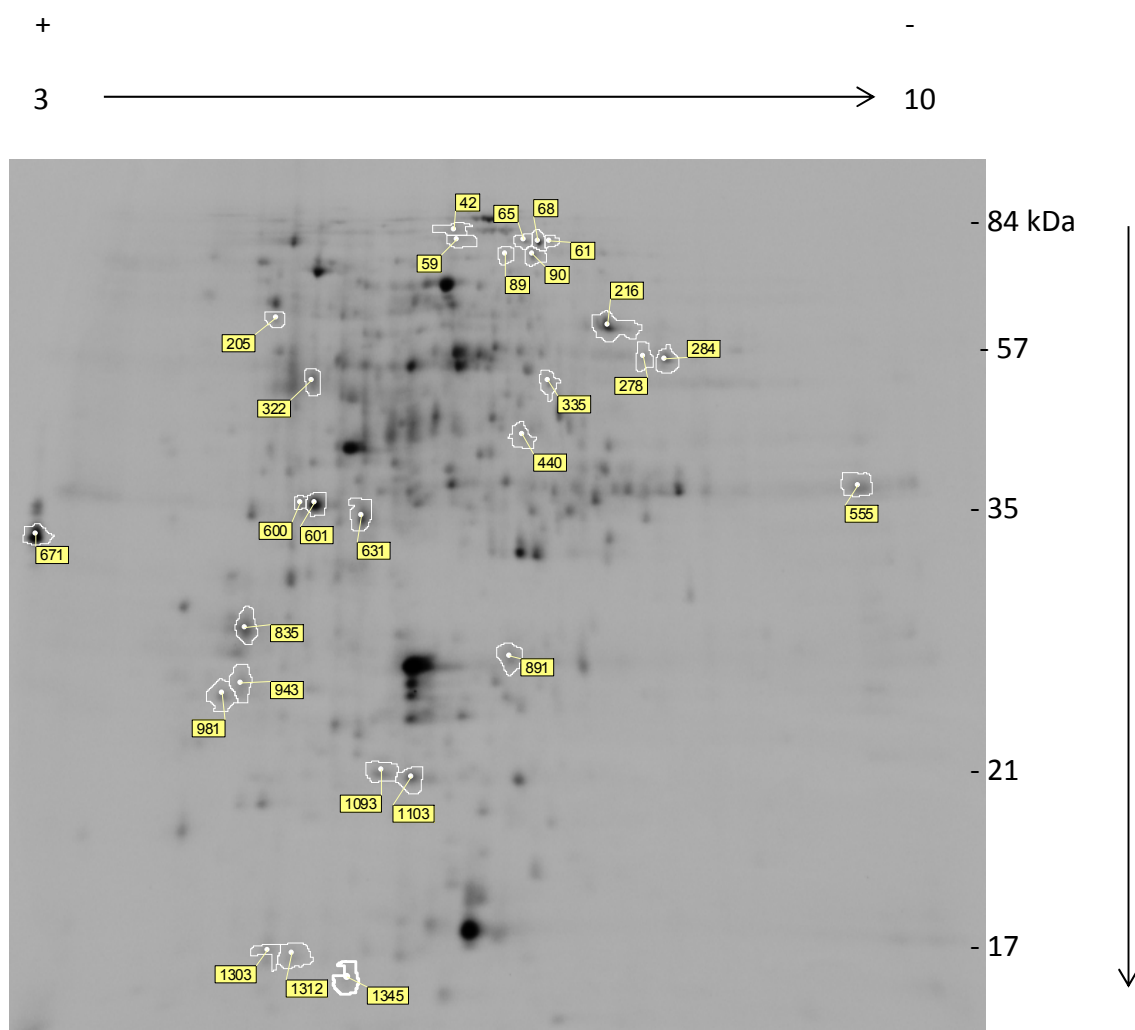


Figura 38: Localización de los spots correspondientes a POI en el gel Master

5.3.2.4. ANÁLISIS DE PCA

Spot Maps (Score Plot)

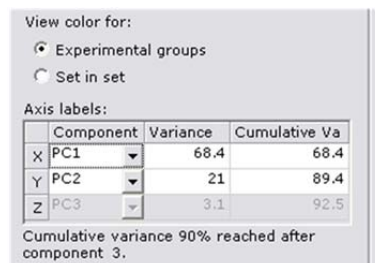
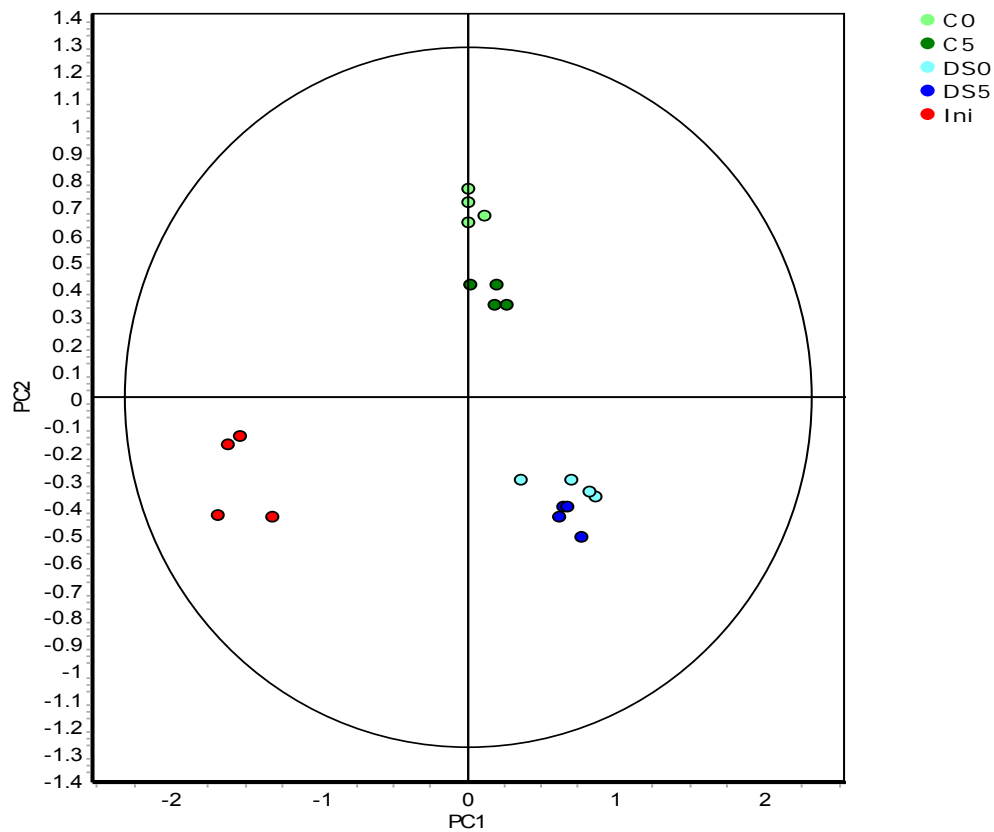


Figura 39: Análisis de componentes principales de las 28 POI según el módulo DEA del software DeCyder

El Análisis de Componentes Principales se llevó a cabo con el objetivo de identificar las características más relevantes del conjunto de datos recuperados de los geles 2D-DIGE. El PCA identifica nuevas variables llamadas “componentes principales” que son una combinación lineal de las variables originales. Estas nuevas variables pueden describir una gran cantidad de datos en una menor dimensión espacial, lo que hace al PCA una herramienta útil para la clasificación de los datos (Ringnér, 2008; Nilo et al., 2010).

Utilizando los datos de los spots definidos como POI (28) se obtuvo el PCA que se muestra en la (Fig. 39). En este ensayo, las dos componentes principales representan cerca del 93% de la varianza original, con valores de 68,4% para la primera componente y 21% para la segunda componente. El análisis de las cargas (*loadings*) asociadas a cada spot indica qué proteínas tienen un mayor impacto/peso en la tendencia observada en el gráfico de PCAs (Tabla 17).

La primera componente (PC1; ejeX) es capaz de separar los frutos iniciales de los frutos conservados durante 4 semanas. Las proteínas P42; P68; P89; P90; P440; P601 y P835; P 981; P 1093; P 1103; y P 1303; parecen tener un gran impacto en esta clasificación (Tabla 17).

La segunda componente (PC2; ejeY) es capaz de separar los frutos control de los frutos tratados e iniciales. Las proteínas P 216; P335; y P555; parecen tener un papel destacado en esta clasificación.

	PC1	PC2
P 42	0,805	-0,150
P 59	0,082	0,506
P 61	-0,668	0,065
P 65	-0,523	0,616
P 68	-0,723	0,393
P 89	0,808	0,239
P 90	0,853	0,240
P 205	-0,342	-0,522
P 216	0,033	0,797
P 278	-0,256	-0,065
P 284	-0,469	0,037
P 322	-0,538	0,001
P 335	0,422	0,835
P 440	0,912	-0,236
P 555	-0,182	0,930
P 600	0,588	-0,613
P 601	0,821	-0,325
P 631	0,569	0,580
P 671	-0,530	0,360
P 835	0,861	-0,410
P 891	0,664	0,245
P 943	-0,464	0,831
P 981	0,700	-0,082
P 1093	0,735	0,114
P 1103	0,781	-0,499
P 1303	0,770	-0,087
P 1312	0,618	0,071
P 1345	0,570	-0,685

Tabla 17: "Loading values" de cada proteína para la primera y segunda componentes del PCA

5.3.3. ESTUDIO 2: IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DIFERENCIALES MEDIANTE HUELLA PEPTÍDICA Y FRAGMENTACIÓN DE PÉPTIDOS.

En la [ANEXO 5](#) se detallan los resultados de las búsquedas combinadas de la huella peptídica y MS-MS (péptidos fragmentados) contra la base de datos NCBI con restricción taxonómica a *Viridiplantae*, contra la base de datos del TAIR (*Arabidopsis thaliana*) y contra la base de datos de PHYTOZOME con restricción a *Prunus persica*.

En la [ANEXO 6](#) se muestra una tabla con el pl y PM de cada spot y la accesión, score, coverage y nombre de cada proteína en cada una de las bases de datos consultadas.

En el [ANEXO 7](#) se muestra una tabla resumen con los nombres asignados en cada base de datos.

A continuación se muestra una tabla resumen con la identificación de la lista de proteínas diferenciales (POI) ([Tabla 18](#)).

POI	spot	ATG	nombre
1	42		
2	59		
3	61		
4	65		
5	68	AT5G17920	Metionina sintasa
6	89	AT1G20030	Taumatina
7	90	AT5G67360	
8	205	AT5G60390	Factor de elongación- 1 α
9	216	AT1G20440	Dehidrina RD17
10	278		
11	284	AT4G35090	Catalasa 2
12	322	AT1G76180	Dehidrina ERD14
13	335	AT3G22200	GABA Transaminasa
14	440		
15	555	AT3G08030	DUF642
16	600	AT1G05010	Enzima formadora de etileno, ACO4
17	601	AT1G05010	Enzima formadora de etileno, ACO4
18	631	AT1G23740	Alquenal/ona oxidorreductasa, AOR
19	671		
20	835	AT1G05010	Enzima formadora de etileno, ACO4
21	891		
22	943	AT3G45310	Cisteín proteasa
23	981	AT5G24090	Quitinasa A
24	1093	AT5G58070	Lipocalina inducible por temperatura, TIL
25	1103	AT5G54500	Quinona reductasa 1, FQR1
26	1312	AT1G24020	Bet v I
27	1303	AT1G24020	Bet v I
28	1345	AT5G12020	Proteína de choque térmico 17, HSP17.6 II

Tabla 18: Resumen de la identificación de las 28 POI. En rojo, proteínas no identificadas.

5.3.4. ESTUDIO 1+2: IDENTIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PCA

La primera componente (PC1; ejeX) (Fig.39) es capaz de separar los frutos iniciales de los frutos conservados durante 4 semanas. Esto podría ser el reflejo de procesos tales como la maduración y/o la frigoconservación. Las proteínas P 68; Metionina sintasa, P89; Taumatina, P601 y P835; ACO4, P 981; Quitinasa A, P 1093; Lipocalina, P 1103; Quinona reductasa y P 1303; Bet v I, parecen tener un gran importancia en esta clasificación.

La segunda componente (PC2; ejeY) (Fig.39) es capaz de separar los frutos control de los frutos tratados e iniciales. Esto podría hacer referencia al desarrollo de daño por frío; mayor en frutos control que en frutos tratados o recién cosechados. Las proteínas P 216; Dehidrina RD17, P335; GABA-transaminasa y P555; DUF642, parecen tener un papel destacado en esta clasificación.

	PC1	PC2	PC1	PC2
P 42	0,805	-0,150	X	
P 59	0,082	0,506	X	
P 61	-0,668	0,065		
P 65	-0,523	0,616		
P 68	-0,723	0,393	Metionina sintasa	
P 89	0,808	0,239	Taumatina	
P 90	0,853	0,240	X	
P 205	-0,342	-0,522		
P 216	0,033	0,797		Dehidrina RD17
P 278	-0,256	-0,065		
P 284	-0,469	0,037		
P 322	-0,538	0,001		
P 335	0,422	0,835		GABA-transaminasa
P 440	0,912	-0,236	X	
P 555	-0,182	0,930		DUF 642
P 600	0,588	-0,613		
P 601	0,821	-0,325	ACO4	
P 631	0,569	0,580		
P 671	-0,530	0,360		
P 835	0,861	-0,410	X	
P 891	0,664	0,245		
P 943	-0,464	0,831		
P 981	0,700	-0,082	Quitinasa A	
P 1093	0,735	0,114	Lipocalina	
P 1103	0,781	-0,499	Quinona Reductasa	
P 1303	0,770	-0,087	Bet v I	
P 1312	0,618	0,071		
P 1345	0,570	-0,685		

Tabla 21: "Loading values" de cada proteína para la primera y segunda componentes del PCA

5.3.5. ESTUDIO 3: ANÁLISIS DE CATEGORÍAS FUNCIONALES.

Con el objetivo de elaborar una clasificación ontológica de las POI, se realiza una solicitud de identificadores únicos (GO) a distintas plataformas, en base a la categoría “procesos biológicos”. A continuación se muestra un resumen de los procesos biológicos en los que están implicadas las proteínas diferenciales identificadas.

Plataforma	GO	proceso biológico	nº genes	% genes	SPOT
GC	GO:0009409	response to cold	6	37,5	322
GC					631
GC					216
GC					1093
GC					981
VP					284
GC	GO:0010183	pollen tube guidance	1	6,25	335
GC	GO:0009651	response to salt stress	2	12,5	68
GC					981
GC	GO:0009408	response to heat	2	12,5	1093
GC					1345
GC	GO:0009737	response to abscisic acid stimulus	2	12,5	322
GC					216
GC	GO:0046686	response to cadmium ion	2	12,5	335
GC					68
GC	GO:0009607	response to biotic stimulus	1	6,25	1303y1312
GC	GO:0042538	hyperosmotic salinity response	1	6,25	1093
GC	GO:0010286	heat acclimation	1	6,25	216
GC	GO:0009642	response to light intensity	1	6,25	981
GC	GO:0010154	fruit development (BP)	1	6,25	335
GC	GO:0010043	response to zinc ion	1	6,25	68
GC	GO:0051707	response to other organism	1	6,25	89
GC	GO:0009620	response to fungus	1	6,25	600,601y835
GC	GO:0009086	methionine biosynthetic process	1	6,25	68
GC	GO:0006950	response to stress	2	12,5	322
GC					216
GC	GO:0009631	cold acclimation	1	6,25	216
GC	GO:0022621	shoot system development	1	6,25	335
GC	GO:0009693	ethylene biosynthetic process	1	6,25	600,601y835
GC	GO:0042631	cellular response to water deprivation	1	6,25	981
GC	GO:0009415	response to water	2	12,5	322
GC					216
GC	GO:0009269	response to desiccation	1	6,25	322
GC	GO:0071398	cellular response to fatty acid	1	6,25	600,601y835
GC	GO:0009865	pollen tube adhesion	1	6,25	335
GC	GO:0009450	gamma-aminobutyric acid catabolic process	1	6,25	335
GC	GO:0006540	glutamate decarboxylation to succinate	1	6,25	335
GC	GO:0010033	response to organic substance	1	6,25	335
GC	GO:0019484	beta-alanine catabolic process	1	6,25	335
VPy Phy	GO:0006414	translational elongation	1	6,25	205
VP	GO:0008150	biological proces	1	6,25	555
VPy Phy	GO:0006508	proteolysis	1	6,25	943
VP	GO:0055114	oxidation-reduction proces	1	6,25	1103
VP	GO:0009733	response to auxin stimulus	1	6,25	1103
VP	GO:0045454	cell redox homeostasis	1	6,25	284
VP	GO:0006995	cellular response to nitrogen starvation	1	6,25	284
VP	GO:0016036	cellular response to phosphate starvation	1	6,25	284
VP	GO:0009970	cellular response to sulfate starvation	1	6,25	284
VP	GO:0042744	hydrogen peroxide catabolic process	1	6,25	284
VP	GO:0009648	photoperiodism	1	6,25	284
VP	GO:0009416	response to light stimulus	1	6,25	284
VPy Phy	GO:0006979	response to oxidative stress	1	6,25	284

Tabla 22: Categorías funcionales a nivel de procesos biológicos de las POI. Siendo, GC: GeneCodis; VP: Virtual Plant; Phy: Phytozome; ATG: homología a genes en *Arabidopsis*.

En (ANEXO 8; PDF) se muestra la información de la tabla 22 desglosada.

A continuación se muestra una representación gráfica del enriquecimiento en GO (categoría Procesos Biológicos) de la “lista de POI” (lista de ATG que nos devuelve el TAIR al hacer BLAST) según GeneCodis.

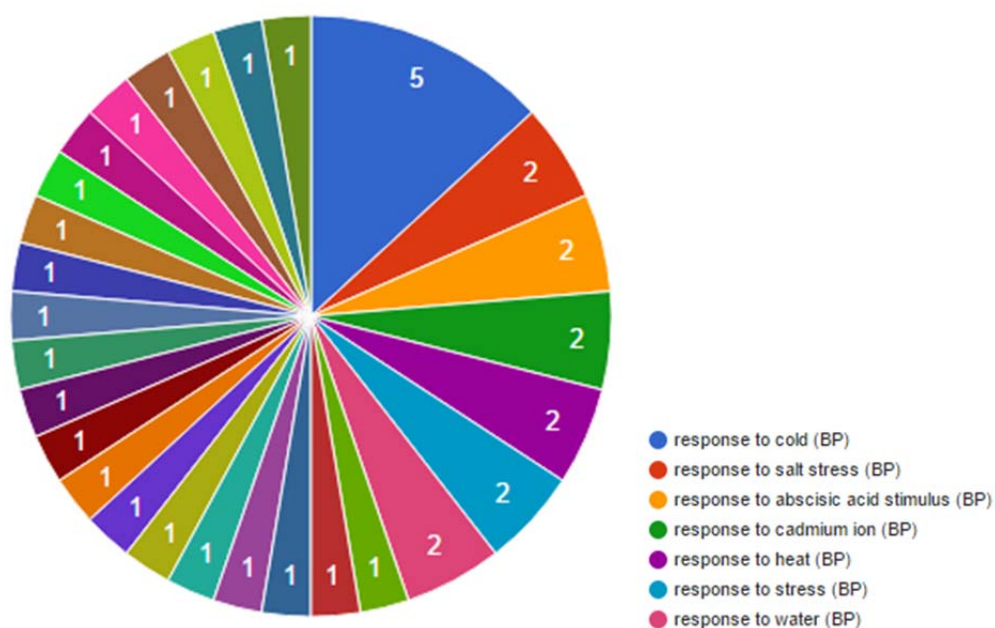


Figura 44: Enrichment in GO. Número de genes por anotación

En la Fig. 45 (ANEXO 9; PDF) se muestra el mapa de procesos biológicos (*comparison chart*) que devuelve la plataforma Quick GO (Gene Ontology) al hacer la consulta con el listado de GO del GeneCodis.

Como puede verse (tanto en la Fig.45; ANEXO 9 como en la Fig. 44), y como era de esperar, en la frigoconservación de una variedad de melocotón sensible a daño por frío, la mayoría de las proteínas diferenciales expresadas tienen que ver con procesos biológicos de estrés y respuesta a estímulos abióticos (temperatura, agua, etc). También hay una parte de ellas relacionadas con respuesta a estímulos bióticos y otra parte relacionada con procesos metabólicos.

Agrupando toda la información obtenida de las distintas plataformas utilizadas, este sería un resumen de los procesos en los que participan las proteínas diferenciales

- Respuesta a estímulos:

- **Cold**
 - 216, 322 Dehidrina
 - 284, Catalasa
 - 631, Alquenal/ona oxidoreductasa, AOR
 - 981, Quitinasa
 - 1093 Lipocalina inducible por temperatura, TIL
- **Heat**
 - 1093, Lipocalina inducible por temperatura, TIL
 - 1345 Proteína de choque térmico 17, HSP 17.6 II
- **Stress**
 - 216, 322 Dehidrina
- * **Salt stress**
 - 68 Metionina sintasa
 - 981 Quitinasa
- * **Oxidative stress**
 - 284 Catalasa
- **Water**
 - 216, 322 Dehidrina
- **Light**
 - 981 Quitinasa
- **Biotic stimulus**
 - 89 Taumatina
 - 1303y1312 Bet v I
- **fatty acid**
 - 600,601y835 Enzima formadora de etileno, ACO4
- **organic substances**
 - 335 GABA-Transaminasa
- **respuesta a auxina**
 - 1103 Quinona reductasa 1, FQR1

- Procesos metabólicos:

- **Biosíntesis**
 - 68 Metionina sintasa
- **Catabolismo**
 - 335 GABA-Transaminasa
- **Proteólisis**
 - 943 Cisteín proteasa
- **Procesos de oxidación-reducción**
 - 1103 Quinona reductasa 1, FQR1

Otros procesos:

555 DUF642

5.3.6. ESTUDIO 4: ANÁLISIS DE CLUSTER

El análisis de Cluster muestra gráficamente la relación entre proteínas diferenciales, uniendo en el mismo grupo/cluster aquellas proteínas que muestran un mismo patrón de expresión en distintas condiciones de ensayo. Tres grandes grupos generales pueden visualizarse en nuestras proteínas diferenciales con este análisis (Fig. 46).

El **grupo I (GI)** está representado por aquellas proteínas con alta expresión a tiempo 0 y baja expresión tras 4 semanas de conservación (P68: metionina sintasa, P205: factor de elongación 1- α , P284: catalasa 2, P322: dehidrina ERD14).

Los **grupos II y III (GII y GIII)** están representados por aquellas proteínas con baja expresión a tiempo 0 y alta expresión tras 4 semanas de conservación (P600-601-835: enzima formadora de etileno ACO4, P631: alquenal/ona oxidorreductasa AOR, P943: cisteín proteasa, P981: quitinasa A, P1093: lipocalina inducible por temperatura TIL, P1103: quinona reductasa 1, P1303-1312: Bet v I, P1345: proteína de choque térmico 17)

El **grupo III (GIII)** además está representado por un conjunto de proteínas con alta expresión en frutos tratados y baja expresión en frutos control (P600-601-835: enzima formadora de etileno ACO4, P981: quitinasa A, P1303-1312: Bet v I)

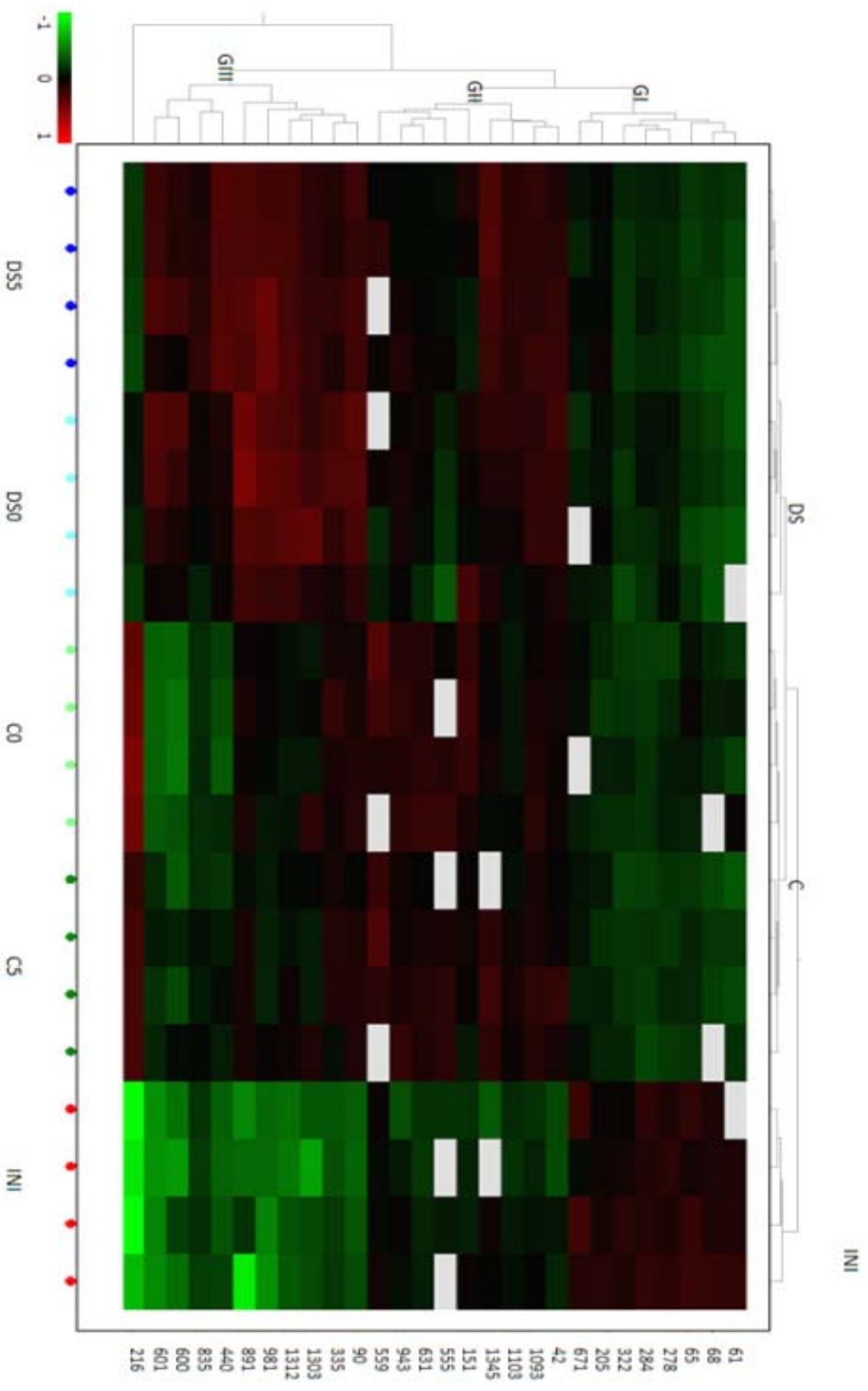


Figura 46: Análisis de Cluster de nuestras 28 POI. Según módulo EDA del software DeCyder aplicando los algoritmos de distancia euclídea y linkage promedio para el cálculo de distancias y su transformación.

5.3.7. ESTUDIO 5: ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA FRIGOCONSERVACIÓN, LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN FRIGORÍFICA Y EL TRATAMIENTO POSTCOSECHA, SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DIFERENCIALES.

Como se comentó anteriormente, estas comparaciones nos permitirán contestar a una serie de preguntas en relación al posible efecto de la frigoconservación, de la temperatura de conservación frigorífica y del tratamiento postcosecha (acondicionamiento térmico), sobre la expresión de proteínas diferenciales ya identificadas. A continuación se describirá y discutirá la posible función de estas proteínas en relación con la tolerancia del fruto de melocotón a la frigoconservación (Tabla 23; ANEXO 10).

spot	conservación					tratamiento			temperatura		
	C0, C5, DS0,	C	DS	0°	5°	DS/C	0°	5°	0/5°	C	DS
	C0, C5 / DS0, / Ini	C0, C5 / Ini	DS0, DS5 / Ini	C0, DS0 / Ini	C5, DS5 / Ini	DS0, DS5 /	DS0 / C0	DS5 / C5	C0,DS0 / C5,DS5	C0/C5	DS0/DS5
42	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
59	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
61	-	ns	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
65	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
68	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
89	+	ns	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns
90	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
205	ns	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
216	+	+	+	+	+	-	-	-	ns	ns	ns
278	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
284	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
322	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
335	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
440	+	ns	+	ns	+	+	+	+	ns	ns	ns
555	ns	ns	ns	ns	ns	-	ns	ns	ns	ns	ns
600	ns	ns	+	ns	+	+	+	ns	ns	ns	ns
601	+	+	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns
631	+	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
671	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
835	ns	ns	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
891	+	+	+	+	+	+	ns	+	ns	ns	ns
943	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
981	+	+	+	+	+	+	+	+	ns	ns	ns
1093	+	ns	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1103	ns	ns	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1303	+	+	+	+	+	+	ns	ns	ns	ns	ns
1312	+	+	+	+	+	+	+	+	ns	ns	ns
1345	+	ns	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 23 (ANEXO 10; PDF): Resumen de las comparaciones de interés significativas entre las distintas condiciones ensayadas.

En azul: las comparaciones de interés

En rojo: proteínas no identificadas

+: expresión de la proteína en la condición del numerador>expresión en el denominador

-: expresión de la proteína en la condición del numerador<expresión en el denominador

ns: no existen diferencias significativas de expresión entre numerador y denominador

5.3.7.1. EFECTO DE LA CONSERVACIÓN

Cuando comparamos las distintas condiciones ensayadas respecto a los frutos tras la recolección (ini) (Tabla 23; ANEXO 10), se observa un efecto del tiempo de conservación en la acumulación de algunas proteínas diferenciales.

- Las proteínas 68, 205, 284 y 322 **reducen sus niveles** con la frigoconservación respecto al momento de cosecha.

68: Metionina sintasa

205: Factor de elongación-1 α

284: Catalasa 2

322: Dehidrina ERD14

Estos resultados coinciden con el GI del Análisis de Cluster (Fig. 46).

- Las proteínas 89, 216, 335, 601=600=835, 631, 943, 981, 1093, 1103, 1303=1312, 1345 **incrementan sus niveles** con la frigoconservación respecto al momento de cosecha.

89: Taumatina

216: Dehidrina RD17

335: GABA-Transaminasa

600-601-835: Enzima formadora de etileno, ACO4

631: Alquenal/ona oxidoreductasa, AOR

943: Cistein proteasa

981: Quitinasa A

1093: Lipocalina inducible por temperatura, TIL

1103: Quinona reductasa 1, FQR1

1303-1312: Bet v I

1345: Proteína de choque térmico 17, HSP17.6II

Resultados coincidentes con la PC1 (Tabla 21).

5.3.7.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN

Si nos fijamos sólo en las comparaciones entre condiciones de ensayo a las 4 semanas (C0, DS0, C5 y DS5) (Tabla 23; ANEXO 10), no se observa ningún efecto de la temperatura de conservación en los niveles de proteínas diferenciales; ninguna proteína se reduce o se incrementa de forma significativa en frutos frigoconservados a 0°C respecto a 5°C y viceversa. Estos resultados no eran los esperados ya que tal y como se observó en la caracterización

varietal de “Elegant lady” descrita en el bloque 1 (estudio 2a), la temperatura de conservación frigorífica tiene un efecto notable en todos los parámetros de calidad estudiados. Esto podría estar indicándonos que el momento elegido para el estudio de expresión diferencial, sin ser malo, no ha sido el óptimo. Quizá a las 4 semanas de conservación, el fruto está en un estado avanzado de maduración y las posibles diferencias de expresión debidas a la temperatura de conservación dejan de apreciarse. Esto también fue observado al estudiar el perfil de aromas; a medida que incrementa el periodo de frigoconservación disminuyen las diferencias de emisión entre las distintas condiciones ensayadas (Fig. 21).

5.3.7.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO POSTCOSECHA (ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO)

Si nos fijamos sólo en las comparaciones entre condiciones de ensayo a las 4 semanas (C0, DS0, C5 y DS5) (Tabla 23; ANEXO 10), sí se observa un efecto del acondicionamiento térmico en la expresión de algunas proteínas diferenciales.

- Las proteínas 216 y 555 **reducen sus niveles** en frutos sometidos a acondicionamiento térmico a 20°C respecto a frutos refrigerados directamente.

216: Dehidrina RD17

555: DUF642

Estos resultados coinciden con la PC2 (Tabla 21).

- Las proteínas 89, 600=601, 981 y 1303=1312 **incrementan sus niveles** en frutos tratados respecto a frutos no tratados.

89: Taumatina

600-601-835: Enzima formadora de etileno, ACO4

981: Quitinasa A

1303-1312: Bet v I

Resultados coincidentes con el GIII del Análisis de Cluster (Fig. 46).

5.3.7.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS PROTEÍNA A PROTEÍNA

En este apartado se analizarán los resultados asociados a cada proteína, observando en cada caso:

1: el efecto de la frigoconservación y/o

2: el efecto del tratamiento postcosecha (acondicionamiento térmico)

Siguiendo la misma nomenclatura (+/-) utilizada en la (Tabla 23; ANEXO 10).

P68: METIONINA SINTASA; 1(-)

P68 es un enzima que participa en la regeneración de metionina a través del ciclo de SAM (S-adenosil metionina) o Ciclo de Yang. Las plantas son los únicos eucariotas superiores que tienen los enzimas necesarios para la síntesis de metionina (Ravanel et al., 1998).

- Los niveles de la proteína P68 disminuyen tras la conservación en frío de los frutos durante 4 semanas, con respecto al momento de la recolección.

La metionina es un precursor necesario para la síntesis de etileno (Fig. 48), una hormona asociada a la respuesta a estrés por frío y a la maduración.

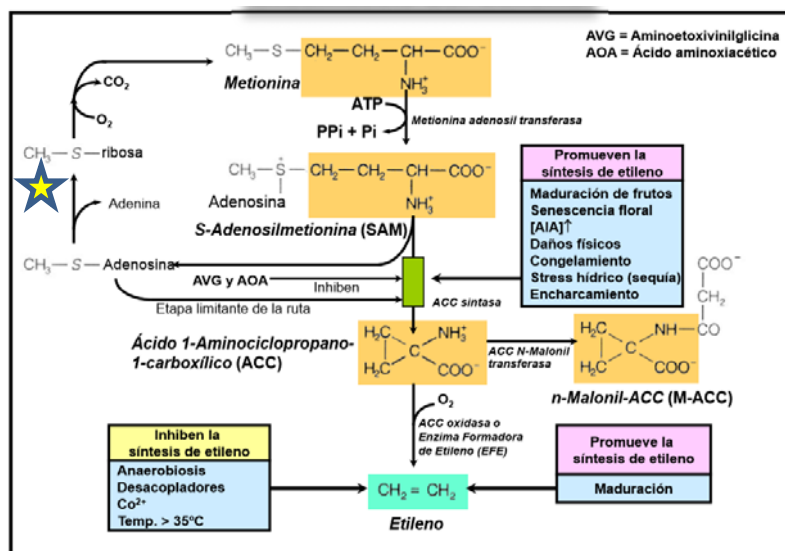


Fig 48: Biosíntesis de etileno : Ciclo de SAM

Por ello se esperaría que, la proteína P68 que participa en la regeneración de la metionina necesaria para la síntesis de etileno, también incrementara frente a estrés. ¿Cómo compatibilizar este resultado con lo esperado? Una posible explicación sería que se estuviera utilizando el sustrato de esta enzima (SAM) para otro proceso. La **Ruta de síntesis de poliaminas a partir de SAM** (Fig. 49) es un proceso paralelo al proceso en el que participa la P68. La ruta de síntesis de poliaminas se activa por muchos procesos, entre ellos por estrés y maduración. Tal y como se comentó anteriormente, las poliaminas son pequeños policationes que pueden participar en distintos procesos como la regulación de la replicación del DNA, transcripción de genes, división celular, el desarrollo de órganos, maduración, senescencia y en respuesta a diferentes estreses bióticos y abióticos (Bouchereau et al., 1999). Putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) son las poliaminas más abundantes en bacterias, plantas y animales. La hipótesis de que la síntesis de poliaminas puede estar relacionada con la defensa de los tejidos vegetales al frío, está basada en la capacidad de estos compuestos para estabilizar las membranas celulares (Wang, 1987). Asimismo, se piensa que su modo de acción frente al estrés y la senescencia puede ser debido a la capacidad para secuestrar radicales libres que se forman en la peroxidación de lípidos (Drolet et al., 1986).

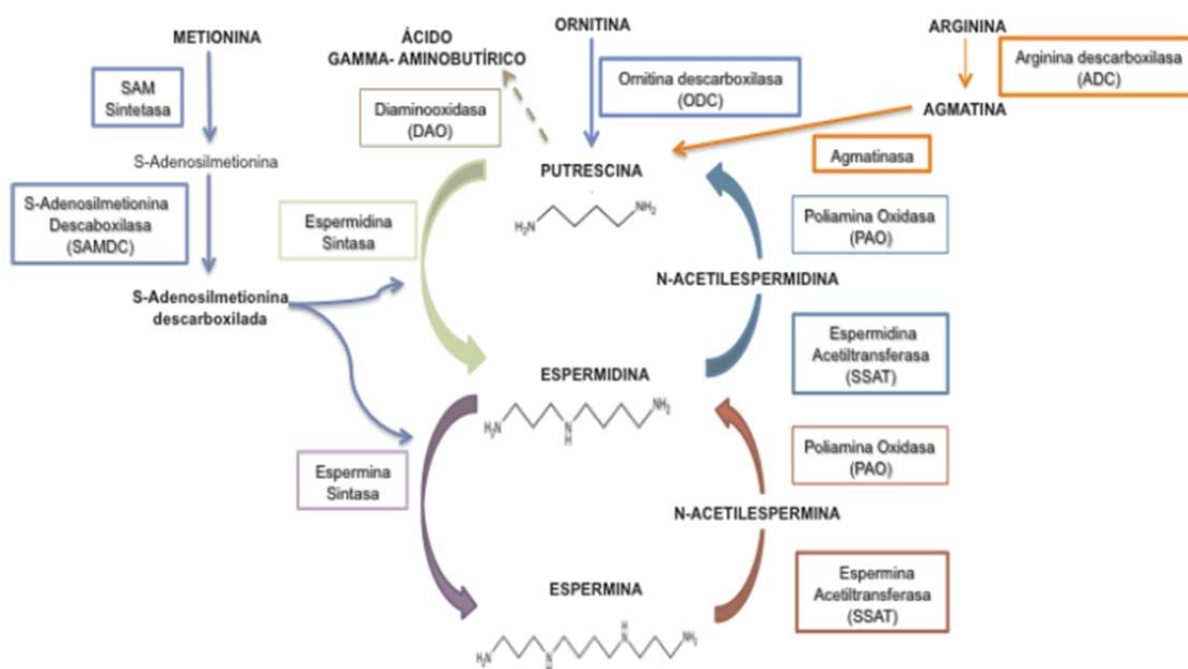


Fig 49: Metabolismo de las poliaminas (Guasco Herrera et al., 2014)

Cuando se sintetiza la Spd o la Spm, el S-metiltiorribósido sufre una serie de transformaciones de tal manera que se recupere la metionina. Dicha ruta se conoce como **Ruta de salvamento de la metionina** (Fig. 50). Esto explicaría que siga habiendo metionina disponible para la síntesis de etileno a pesar de la inhibición o bloqueo del Ciclo de SAM tras frigoconservación.

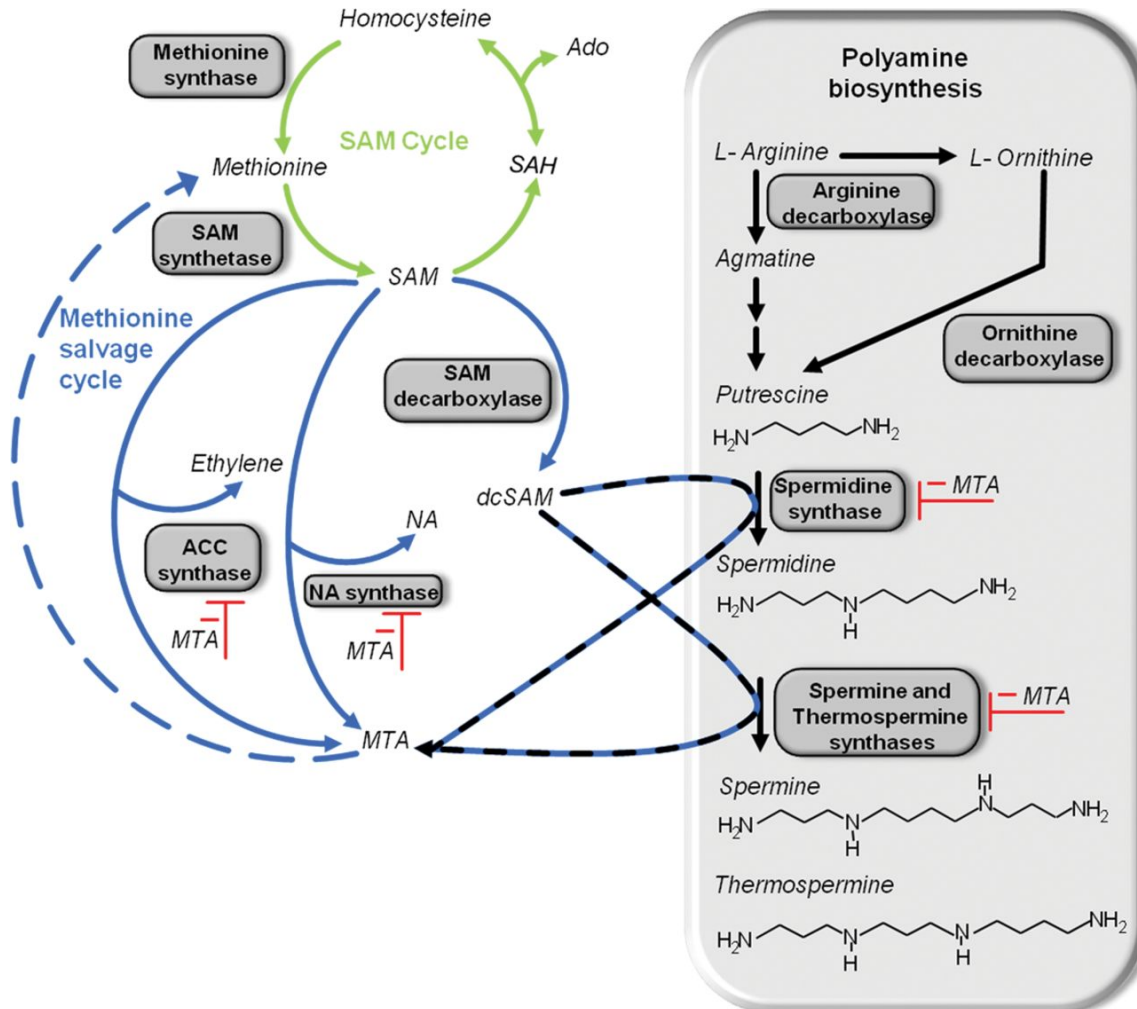


Fig 50: Ruta de "Salvamento de la Metionina" (Sauter et al., 2013).

Siendo, SAM: s.adenosilmetionina; MTA: metiltioadenosina

P 205: FACTOR DE ELONGACIÓN 1- α ; 1(-)

P205 es una proteína que pertenece a la familia de los factor de elongación que unen GTP y a la subfamilia EF-Tu (en procariotas)/EF-1A (en eucariotas). Los factores de elongación forman parte del mecanismo que sintetiza nuevas proteínas por traducción en el ribosoma. El dominio GTP-binding parece estar relacionado con los cambios conformacionales de la proteína por hidrólisis de GTP a GDP (Möller et al., 1987). En respuesta a estrés por frío, las células procariotas y eucariotas generalmente suprimen la transcripción y la traducción posterior, con excepción de un número de proteínas de respuesta a frío cuya síntesis es continua o incluso incrementa durante el choque por frío (Al-Fageeh & Smales, 2006).

- Los niveles de la proteína P205 disminuyen tras la conservación en frío de los frutos durante 4 semanas con respecto al momento de la recolección.

Estos resultados eran los esperados ya que la traducción es un proceso de alta exigencia de energía y, en consecuencia, es uno de los objetivos principales que se inhibe en respuesta a la mayoría de los tipos de estrés celular (Echevarría-Zomeño et al., 2013).

P 216: DEHIDRINA, RD17; 1(+), 2(-)

P216 es una proteína de la multifamilia de las dehidrinas. Las dehidrinas son proteínas de estrés con un alto número de aminoácidos cargados que pertenecen al Grupo II de la familia de proteínas LEA (del inglés *Late Embryogenesis Abundant*) (Yang et al., 2012). Las proteínas inducidas por deshidratación en plantas fueron observadas por primera vez en 1989 (Close et al., 1989) y ya han sido identificadas como la base genética de la tolerancia a la sequía. Se sabe que las dehidrinas se inducen por factores ambientales (sequía, salinidad, bajas temperaturas, etc.) que dan lugar a estrés por deshidratación celular (Close, 1997; Wisniewski et al., 2006). Se han propuesto como estabilizadores de membranas celulares protegiendo a otras proteínas de la desnaturalización cuando el contenido de agua celular se reduce durante la deshidratación (Allagulova et al., 2003; Close, 1997). Hundertmark & Hinch (2008) mostraron que solo algunas dehidrinas están situadas en las proximidades de las membranas, pero no tuvieron ninguna evidencia de su función. Algunas dehidrinas también muestran actividad detoxificadora de ROS e iones metálicos (Hara, 2010). Se ha observado la presencia de dehidrinas en respuesta a baja temperatura (Hanin et al., 2011; Graether & Boddington, 2014) tanto en plantas herbáceas como en plantas leñosas (Bassett et al., 2009; Wisniewski, 2003) y en concreto en melocotón, tanto en corteza (Wisniewski et al., 2006) como en mesocarpo (Ogundiwin et al., 2008b; Nilo et al., 2010) sugiriendo así su actividad crioprotectora. Se sabe también que el etileno puede inducir la acumulación de dehidrinas (Richard et al., 2000; Yu et al., 2001).

Si bien en general se acepta que las dehidrina son biomoléculas multifuncionales que protegen a las células del daño causado por la deshidratación inducida por el estrés (Hara, 2010; Yang et al., 2012; Navarro et al., 2015), su mecanismo exacto sigue sin conocerse.

- Los niveles de la proteína P216 incrementan tras la conservación en frío de los frutos durante 4 semanas con respecto al momento de la recolección.

Tal y como se esperaba tratándose de proteínas de estrés y teniendo en cuenta que el frío a su vez provoca estrés por deshidratación y que Nylander et al., (2001) demostraron que el frío era el inductor principal de la síntesis de P216 (dehidrina COR47=RD17) en *Arabidopsis thaliana*.

- A su vez los niveles de la proteína P216 incrementan en frutos control (con más daños por frío) con respecto a frutos tratados (con menos daños por frío).

En la caracterización varietal, llevada a cabo en el bloque 1, se observa que el principal daño por frío desarrollado en la variedad “Elegant Lady” es la harinosidad y su consecuente pérdida de jugosidad. Y se observa que en frutos tratados (DS) se incrementaba la jugosidad con respecto a frutos control (Fig. 7). Estos resultados apoyarían por tanto que el tratamiento postcosecha evita o disminuye la deshidratación celular que promueve la expresión de esta proteína.

P 284: CATALASA 2; 1(-)

P284 es una Catalasa; un enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esta enzima se ha asociado a la protección célula contra daño oxidativo por ROS.

- Los niveles de la proteína P284 disminuyen tras la conservación de los frutos en frío durante 4 semanas con respecto al momento de la recolección.

La senescencia de la fruta puede ser considerado como un fenómeno oxidativo (Qin et al., 2009) que requiere la presencia de ROS con el fin de lograr un estado de degradación que permitirá la liberación de las semillas que se produzcan. Al menos dos catalasas han sido identificadas en *Prunus pérsica*, Catalasa 1 relacionada con foto-respiración y Catalasa 2 relacionada con respuesta a estrés (Bagnoli et al., 2004). Se sabe que la exposición a bajas temperaturas también genera estrés oxidativo. Esperaríamos que esta enzima incrementara su concentración por la exposición a baja temperatura, sin embargo ocurre lo contrario. Resultados similares fueron descritos en *Prunus persica* cv. Okubo, donde la actividad catalasa descendió progresivamente con la conservación a 0°C durante 60 días (Wang et al., 2005). Este efecto negativo sobre la acumulación de catalasa podría ser perjudicial para la fruta conservada en frío debido a los niveles más altos de H₂O₂ que podrían estar presentes en sus células, contribuyendo así al desarrollo de daños por frío.

La menor acumulación de catalasa 2 en frutos de melocotón “Elegant Lady” conservados a baja temperatura podría ser una de las causas de su sensibilidad al daño por frío.

P 322: DEHIDRINA, ERD14; 1(-)

P322 es una proteína que se induce de forma temprana como respuesta al estrés por deshidratación (ERD; del inglés *Early Response to dehydration*). Aunque también está presente en plantas no sometidas a estrés, sus niveles incrementan cuando se someten a estrés por deshidratación (en concreto por frío, salinidad y ABA) (Nylander et al., 2001). Es capaz de interaccionar con la membrana celular, preferentemente si está compuesta por fosfolípidos ácidos. Puede ser fosforilada y esto le hace capaz de unir iones metálicos divalentes. Se ha demostrado in vitro la actividad chaperona de la forma no fosforilada de esta proteína y su interacción con vesículas de fosfolípidos a través de fuerzas electrostáticas (Kovacs et al., 2008).

- Los niveles de la proteína P322 disminuyen tras la conservación en frío de los frutos durante 4 semanas con respecto al momento de la recolección.

Se sabe que las dehidrinas son inducidas por estrés ambiental que da lugar a deshidratación celular (Close, 1997; Wisniewski et al., 2006). En este caso, los resultados son inversos a la dehidrina RD17 (spot 216) probablemente por tratarse de un tipo de dehidrina que se induce por deshidratación sólo de forma temprana (a la hora y a las 5 horas del inicio del estrés por frío en *Arabidopsis thaliana* (Kiyosue et al., 1994)). Inmediatamente después de la recolección de un fruto, éste sufre un fuerte proceso de deshidratación contra el que se intenta luchar desde el campo de la postcosecha para ampliar la vida útil del producto, esto podría explicar la elevada expresión de esta dehidrina de respuesta temprana a la deshidratación principalmente en el momento de la recolección y no en momentos posteriores.

P335: GABA-TRANSAMINASA; 1(+)

P335 es una γ -aminobutirato transaminasa o 4-aminobutirato transaminasa, también llamada GABA transaminasa o 4-aminobutirato aminotransferasa que utiliza piruvato en vez de α -cetoglutarato como cosustrato. Las transaminasas o aminotransferasas son un conjunto de enzimas que transfieren grupos amino desde un metabolito a otro, generalmente aminoácidos. Las reacciones de transaminación son importantes en especial para la síntesis de aminoácidos no esenciales y para la degradación de la mayoría de aminoácidos, que pierden su grupo amino por transaminación, excepto los aminoácidos lisina y treonina, para los que esta reacción no es posible. Hay una aminotransferasa para cada aminoácido exceptuando a esos dos. La P335 cataliza la reacción:

4-aminobutanoato (GABA) + piruvato \leftrightarrow semialdehído succinato + alanina.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor con actividad inhibitoria en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos y también está presente en plantas. Es el aminoácido (no proteínico) más abundante en el apoplasto del tomate (Park et al., 2010). GABA deriva directamente de glutamato, o indirectamente de putrescina (Palma et al., 2014). En general, durante la exposición a baja temperatura, los frutos incrementan los niveles de putrescina (Serrano et al., 1996). GABA se acumula rápidamente en plantas como respuesta a estrés biótico o abiótico (Roberts, 2007). Su catabolismo, principalmente a través de una vía corta denominada “Derivación de GABA” (Fig. 51), está involucrado en diferentes procesos regulatorios incluyendo la regulación osmótica y del pH, el bypass del ciclo de los ácidos tricarboxílicos TCA (ya que bajo condiciones de estrés oxidativo se inhiben ciertas enzimas del ciclo TCA), el mantenimiento del balance C: N (es la manera de asimilar el glutamato y generar un flujo de entrada de C y N en el ciclo TCA) y la producción de agentes reductores y de energía (el último paso de la derivación GABA proporciona succinato y NADH a la cadena respiratoria) (Bouché & Fromm, 2004; Palma et al., 2014).

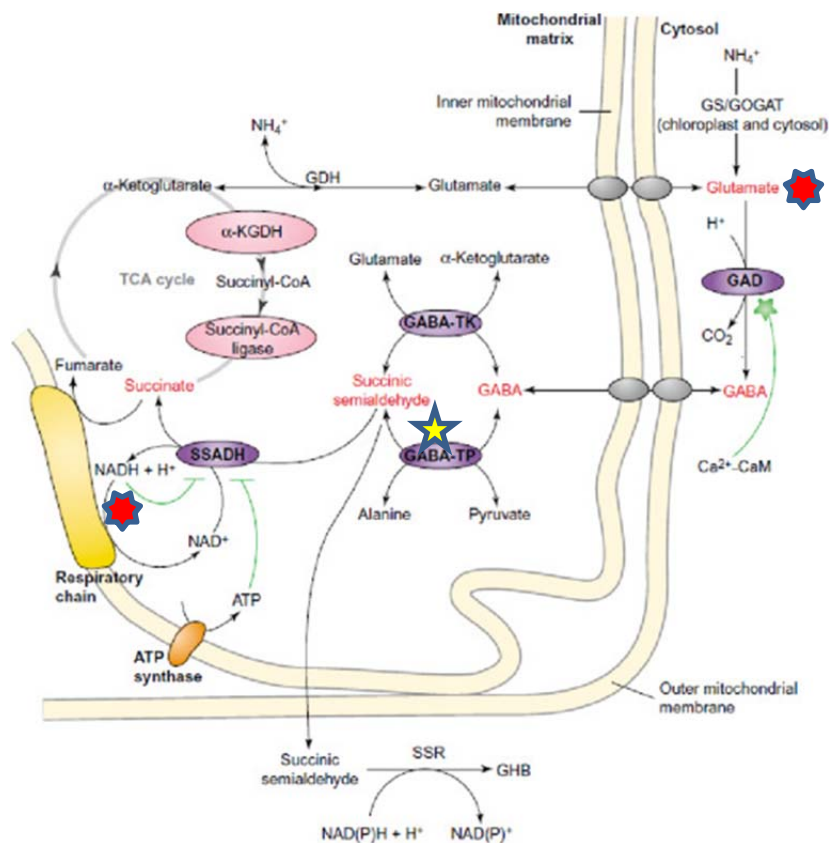


Figura 51: Ruta de “Derivación de GABA” (Bouché & Fromm, 2004)

Por otro lado, estudios en *Arabidopsis* han indicado que GABA también podría tener un papel como molécula señalizadora en plantas (Bouché & Fromm, 2004, Roberts, 2007, Ramesh et al., 2015).

- Los niveles de la proteína P335 incrementan tras la conservación en frío de los frutos durante 4 semanas con respecto al momento de la recolección.

Resultados que coincide con estudios anteriores en postcosecha de calabacín. GABA-T es el enzima principal de la ruta de "Derivación de GABA" y según este estudio esta ruta se induce durante la conservación frigorífica, probablemente con el fin de utilizar GABA como fuentes de C y N. Por otra parte, esta ruta produce energía y agentes reductores, que podrían ayudar a aliviar el estrés oxidativo generado durante la conservación frigorífica (Palma et al., 2014).

P 555: DUF642; 2(-)

P555; es la proteína DUF642. Pertenece a una multi-familia de proteínas cuyo dominio principal tiene función desconocida (DUF; *Domain of Unknown Function*) (Bateman et al., 2010).

El tratamiento térmico postcosecha (HT) es eficaz en la prevención de algunos síntomas de daño por frío que la fruta muestra tras su conservación a baja temperatura. El análisis proteómico diferencial de las proteínas de melocotón "Dixiland" sometido a tratamiento térmico postcosecha (HT; 39°C durante 3 días) reveló una disminución significativa de las proteínas DUF642 después del HT. Tras fusión al marcador GFP y análisis confocal, la proteína se detectó en la pared celular y también en los espacios intercelulares. La localización extracelular sugiere que podría estar jugando un papel en el metabolismo de la pared celular del fruto de melocotón (Bustamante et al., 2012).

- Los niveles de la proteína P555 disminuyen en frutos tratados respecto a frutos control.

Al igual que observan Bustamante et al., (2012), esta proteína ya presente en el momento de la cosecha, se acumula en menor nivel en frutos sometidos a tratamiento térmico. Desconocemos los posibles motivos de este patrón de acumulación.

P 600-601-835: ENZIMA FORMADORA DE ETILENO, ACO4; 1(+), 2(+)

P600-P601-P835 es una de las principales enzimas que controlan la biosíntesis de etileno; es responsable de convertir 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) en etileno mediante

oxidación (Fig. 52). Mecanismos de regulación postraducciona pueden explicar la identificación de hasta 3 spots en nuestro trabajo como la misma proteína (600, 601 y 835), modificaciones ya observadas en estudios anteriores (Nilo et al., 2010).

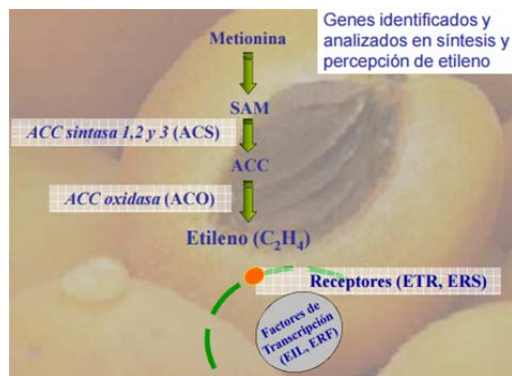


Figura 52: Síntesis de etileno

El etileno regula multitud de procesos en plantas desde la germinación de la semilla hasta la senescencia del fruto. Por su importancia económica es destacable su papel como inductor de la maduración (Bleecker & Kende, 2000). En melocotón y nectarina es esencial para promover la secuencia apropiada de hidrólisis de la pared celular necesaria para ablandamiento normal de la fruta. La síntesis de etileno está regulada por factores internos y externos (Bleecker & Kende, 2000) y se incrementa con el estrés abiótico como es el caso del frío (Alexander, 2002). Al menos en las 4 primeras semanas de conservación se puede observar este incremento al transferir los frutos a temperatura ambiente (Fernández-Trujillo et al., 1998).

El etileno es a menudo un signo de daño por frío incipiente (Zhou et al., 2001), sin embargo esto no ocurre en todos los frutos carnosos susceptibles al desarrollo de daño por frío. Chirimoyas conservadas a temperatura de daño por frío no producen etileno al ser transferidas a 20°C o necesitan más tiempo del normal para alcanzar su máximo climatérico (Alique et al., 1994). A su vez, frutos de nectarina con daño severo por frío tipo “woolliness” disminuyen significativamente su producción de etileno al ser transferidos a 20°C, así, la producción de etileno en nectarinas sanas muestra un típico patrón climatérico, mientras que en nectarinas con daño severo la tasa de producción de etileno disminuye (Zhou et al., 2001). Igualmente se ha observado que la tasa de producción de etileno a 20°C después de conservación frigorífica se correlaciona negativamente con el desarrollo de harinosidad en melocotón (Giné-Bordonaba et al., 2016).

- Los niveles de la proteína P600-601-835 incrementan tras la conservación en frío de los frutos durante 4 semanas con respecto al momento de la recolección.

Resultados coincidentes con lo observado en la caracterización varietal de “Elegant Lady” (bloque 1) en relación a la producción de etileno (Fig. 16 y Tabla 4). Tal y como se esperaba, tanto por el estado de maduración 4 semanas después de cosecha, como por la exposición a frío.

- A su vez los niveles de la proteína P600-601-835 incrementan en frutos tratados con respecto a frutos control.

Resultados que coinciden con lo observado en esta variedad (bloque 1) a las 4 semanas de frigoconservación en relación a la producción de etileno. (Fig. 16 y Tabla 4). Y resultados esperados, teniendo en cuenta que los frutos tratados (DS) adquieren un grado de madurez superior a los frutos no tratados (C) ya antes de su conservación en frío. En nectarina también se ha observado que tanto frutos tratados (DS) como frutos control (C) incrementan la producción de etileno al ser transferidos a 20°C desde frigoconservación a 0°C pero que ese incremento es más rápido en frutos tratados (DS) (Dong et al. 2001).

P631: ALQUENAL/ONA OXIDORREDUCTASA, AOR; 1(+)

P631 es un enzima que actúa sobre compuestos con carbonilos α,β -insaturado.

El estrés abiótico o biótico da lugar a estrés oxidativo (Renaut et al., 2006). El incremento de ROS produce peroxidación de los lípidos de membranas celulares que genera carbonilos reactivos. Estos carbonilos reactivos, especialmente carbonilos α,β -insaturados (Fig. 53), dañan biomoléculas como proteínas y nucleótidos. La eliminación de estos carbonilos por tanto, es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular (Yamauchi et al., 2011). La P631 (AOR), elimina o detoxifica estos carbonilos reactivos mediante reducción del enlace α,β -insaturados.

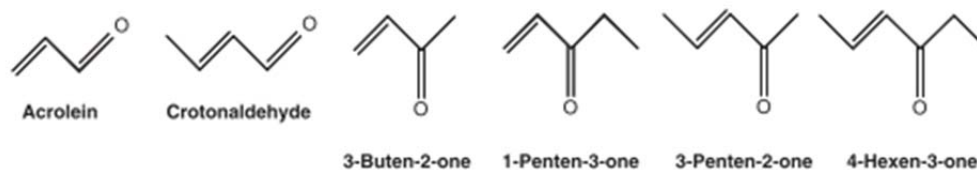


Figura 53: carbonilos α,β -insaturados (Yamauchi et al., 2011)

El pepino contiene dos alquenal/ona oxidorreductasas (AORs) distintas, una cloroplástica y otra citosólica y presenta homologos en distintas especies incluida *Arabidopsis*, también con actividad AOR (Yamauchi et al., 2011). La AOR cloroplástica de *Arabidopsis* puede contribuir a la detoxificación de reactivos carbonilo producidos bajo condiciones de estrés y ayudar así a mantener el proceso de fotosíntesis (Yamauchi et al., 2012). Según Yamauchi et al. (2011) la AOR cloroplástica pertenece a un grupo de proteínas que incluye a la familia de las quinonas oxidorreductasas (ver spot 1103).

- Los niveles de la proteína P631 incrementan tras la conservación de los frutos en frío durante 4 semanas con respecto al momento de la recolección.

Teniendo en cuenta que la exposición a frío genera estrés oxidativo, tiene sentido que, la abundancia de esta proteína detoxificadora de carbonilos reactivos generados por la peroxidación de lípidos bajo condiciones de estrés, sea mayor tras cuatro semanas de conservación frigorífica que en el momento de cosecha. Estos altos niveles podrían estar implicados en la respuesta del fruto al estrés por frío y su adaptación.

P943: CISTEÍN PROTEASA; 1(+)

P943 es un enzima conocido como cisteín proteasa o como tiol proteasa, que degrada proteínas. Estas proteasas comparten un mecanismo catalítico común que involucra al grupo tiol de las cisteínas. El tiol es susceptible a la oxidación para dar lugar a puentes disulfuros derivados de las cisteína que tienen un importante papel estructural en muchas proteínas.

Las cisteín proteasas de plantas desempeñan un papel importante en procesos intra y extracelulares, tales como el desarrollo y la maduración de los frutos como reserva nutricional, degradando proteínas de almacenamiento en la germinación de semillas. Están involucradas también en la maduración, degradación y reconstrucción de proteínas en respuesta a diversos estímulos externos y también desempeñan una función “house-keeping” para eliminar plegamientos anormales de las proteínas. También participan en distintas etapas de desarrollo, tales como la morfogénesis y la biogénesis celular y la senescencia, así como en la muerte celular programada. Además están implicados en la percepción, la señalización y la respuesta al estrés biótico y abiótico, tienen por tanto un papel en la defensa de la planta (Domsalla & Melzig, 2008).

El látex de diferentes familias de plantas contienen cisteín proteasas y estas enzimas se encuentran frecuentemente en fruta (papaya, piña, higo, kiwi etc.) principalmente en estados

inmaduros. Se ha demostrado que estas enzimas protegen contra patógenos de plantas tales como insectos y hongos durante su maduración (Domsalla & Melzig, 2008).

- Los niveles de la proteína P943 incrementan tras la conservación en frío de los frutos durante 4 semanas con respecto al momento de la recolección.

Tal y como esperaríamos ya que esta enzima está involucrada en procesos de desarrollo y maduración de frutos y en defensa frente a estrés.

P 1093: LIPOCALINA INDUCIBLE POR TEMPERATURA, TIL; 1(+)

P1093 es una lipocalina inducible por temperatura (TIL). Es una proteína relacionada con la termotolerancia asociada al exterior de la membrana plasmática. Las lipocalinas son transportadoras de pequeñas moléculas hidrofóbicas, tales como lípidos, hormonas esteroides, bilinas (pigmento) y retinoides. Están asociadas con muchos procesos biológicos.

Las lipocalinas se identificaron por primera vez en plantas y las consideraron un enzima clave del ciclo de la xantofila, responsable de la protección contra el daño por fotooxidación (Bugos et al. 1998). Se recopilaron estudios sobre esta proteína donde se observaban incrementos bajo exposición a frío tanto en *Arabidopsis*, como en *Prunus* (Renaut et al., 2006). Estudios posteriores confirman en *Arabidopsis* que las lipocalinas inducibles por temperatura (TIL) son necesarias para la adquisición de termotolerancia (Chi et al., 2009). En frutos de melocotón conservados a 0°C se observó un incremento en las lipocalinas inducidas por temperatura con respecto a frutos conservados a 5°C (Zhang et al., 2010b).

- Los niveles de la proteína P1093 incrementan tras la conservación en frío de los frutos durante 4 semanas con respecto al momento de la recolección.

Tal y como se esperaba al ser una proteína inducible por exposición a baja temperatura.

P 1103: QUINONA REDUCTASA, FQR1; 1(+)

P 1103 es un enzima que cataliza la reducción de varias quinonas (o benzoquinonas) y otros aceptores de electrones/hidrogenos. Están localizadas en la membrana plasmática. El estado reducido de las quinonas es lo que les confiere su función antioxidante (Nohzadeh et al., 2007).

La benzoquinona es el producto de reacción entre la hidroquinona (Fig. 54) y el peróxido de hidrógeno (ROS). El balance quinona / hidroquinona controlado por la quinona reductasa en la

membrana plasmática podría desempeñar un papel regulador en la transducción de señales (Forthoffer et al., 2002).

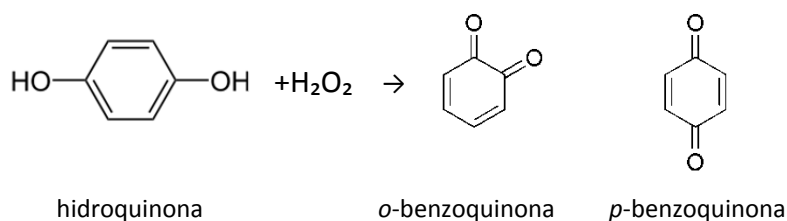


Figura 54: formación de benzoquinonas

La familia de las quinonas oxidoreductasas, junto con la alkenal/ona oxidoreductasa (AOR) (P631) pertenecen a un mismo grupo de proteínas (Yamauchi et al., 2011). Como ya se dijo de la P631, está implicada en mantenimiento del procesos de fotosíntesis detoxificando los carbonilos reactivos formados durante la peroxidación de lípidos que generan estrés oxidativo en células y tejidos y manteniendo así la homeostasis celular.

- Los niveles de la proteína P1103 incrementan tras la conservación en frío de los frutos durante 4 semanas con respecto al momento de la recolección.

Cuando las plantas están sometidas a estrés abiótico o biótico, se produce estrés oxidativo (Renaut et al., 2006). Esta proteína de membrana incrementa su expresión en defensa contra estrés oxidativo (Nohzadeh et al., 2007). Tiene sentido por tanto, que la abundancia de esta proteína, sea mayor tras 4 semanas de exposición a baja temperatura que en el momento de cosecha.

P1345: PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 17, HSP17.6II; 1(+)

P1345 es una proteína pequeña de choque térmico (smHSP) de Clase II de 17.6KDa. Las smHSPs, generalmente indetectable en células de plantas en condiciones normales, son inducidas por estrés por sequía, salinidad, estrés oxidativo y las bajas temperaturas (Timperio et al., 2008). Se ha sugerido para las smHSPs un papel crioprotector (Aghdam et al., 2013) ya que mantienen la fluidez de las membranas y asisten a HSP de mayor PM en el replegado correcto de proteínas parcialmente desnaturalizadas (Timperio et al., 2008). Dentro de las smHSP, se conoce como HSP20 a una grupo de HSP con un peso molecular promedio de 20 KDa (Groenen et al., 1994). Este es el caso de la P1345 (Sanchez-Bel et al., 2012).

La mayor tolerancia al CI de algunos cultivos se ha atribuido a la producción y acumulación de las smHSP (Sevillano et al., 2009). En concreto, incrementa la inducción de proteínas HSP20 en frutos de tomate en respuesta a la conservación frigorífica y parecen jugar un papel clave en la respuesta primaria de los frutos al estrés por frío (Page et al., 2010; Sanchez-Bel et al., 2012).

- Los niveles de la proteína P1345 incrementan tras la conservación en frío de los frutos durante 4 semanas con respecto al momento de la recolección.

Resultados que concuerdan con lo esperado por la exposición a bajas temperaturas, apoyando así el papel crioprotector sugerido por (Aghdam et al., 2013).

P 89:	TAUMATINA	
P981:	QUITINASA A	1(+), 2(+)
P1303-1312:	BET v I	

Las 3 proteínas (P89, P986 Y P1303-1312) son proteínas PR (*Pathogenesis Related*). Se han identificado diecisiete grupos de proteínas PR (Fernandes et al., 2013), varios de los cuales responden a baja temperatura: *PR-2* (β -1,3-glucanasas), *PR-3*, *PR-4*, *PR-8* and *PR-11* (quitinasas), *PR-5* (proteínas taumatina-like) and *PR-10* (homólogos de *Bet v-1*) y *PR-14* (proteínas transportadoras de lípidos) (Griffith & Yaish, 2004; Hinch et al., 1997; Kuwabara et al., 2002; Liu et al., 2003; Yeh et al., 2000; Renaut et al., 2006)

P89 es una proteína de la familia de las taumatinas. Las taumatinas se caracterizan por su alto peso molecular, se han clasificado dentro del grupo 5 de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR-5) (Hiroyuki & Terauchi, 2008). Se dividen en dos subcategorías: una forma básica vacuolar y otra forma ácida apoplásica (Dagar et al., 2010). Son inducidas por varios estímulos que van desde el etileno a los patógenos y son estructuralmente diversas y omnipresentes en las plantas (Linthorst & Van Loon, 1991). Están involucradas en la adquisición de resistencia a patógenos (SAR) y en la respuesta a estrés en plantas, aunque su papel exacto se desconoce (Ward et al., 1991). La mayoría de las proteínas de pared celular que se expresan en mesocarpo de melocotón tras frigoconservación pertenecen a la familia de las taumatinas. Así mismo, la temprana acumulación de transcritos de taumatina en una variedad de melocotón resistente a CI frente a otra sensible, sugiere que taumatina podría estar involucrada en la protección frente a daño por frío (Dagar et al., 2010).

P981 es una Quitinasa A (clase III) que se expresa exclusivamente bajo condiciones de estrés (Takenaka et al., 2009). Las quitinasas de clase III pertenecen al grupo 8 de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR-8). Son hidrolasas extracelulares; rompen enlaces glicosídicos entre carbohidratos o entre carbohidrato y no-carbohidrato. No se relacionan estructuralmente con otras quitinasas de plantas ya que poseen un dominio catalítico conservado que difiere del de las quitinasas de clase I o II (Watanabe et al., 1993). El gen de la quitinasa A (clase III) en *Arabidopsis thaliana* se expresa exclusivamente bajo condiciones de estrés ambiental (Takenaka et al., 2009). En caña de azúcar, la expresión del gen de la quitinasa A (clase III) de una planta resistente a patógeno, está fuertemente inducida tanto por patógeno como por distintos estreses abióticos incluido el frío (4°C), lo que sugiere que este gen actúa en la adquisición de tolerancia frente a estrés biótico y abiótico (Su et al., 2014). En piña, la quitinasa A (ácida de clase III) está presente en todos los tejidos incluido el pericarpio del fruto, en todos los estadios del desarrollo (mientras que las de tipo B y C no están presentes en todos los tejidos y en pericarpio sólo en estadios tempranos) y su síntesis se induce por etileno (Taira et al., 2005). En banana, Peumans et al., (2002) sugieren que se trata de una proteína transitoria de almacenamiento y que muy probablemente sirve como un importante suministro de aminoácidos para la síntesis de proteínas asociadas a la maduración.

P1303-1312 es una proteína de la familia de las Bet v I que pertenece a su vez al grupo 10 de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR-10). Generalmente, las proteínas PR se localizan en las vacuolas o son extracelulares, sin embargo, las proteínas del grupo PR-10 son generalmente intracelulares y citosólicas (Fernandes et al., 2013). Las proteínas PR10 están involucradas en muchos aspectos de la biología de las plantas, pero su función molecular todavía no está clara (Casañal et al., 2013). Su expresión está inducida por patógenos, estrés abiótico, herida o la presencia de fitohormonas, lo que sugiere un papel protector (Fernandes et al., 2013). P1303-1312 es el principal alérgeno del polen de abedul y se expresa también abundantemente en fruta (Schenk et al., 2009). La caracterización estructural de homólogos de Bet v I en fresa (Fra a) sugiere que puede jugar un papel en el control en el metabolismo secundario mediante la unión a intermediarios metabólicos. Además se ha visto que Bet v I y otras PR10 unen una serie de moléculas hidrófobas artificiales y naturales, incluyendo citoquininas y fitosteroides (Casañal et al., 2013).

- Los niveles de las 3 proteínas incrementan tras la conservación en frío de los frutos durante 4 semanas con respecto al momento de la recolección.

La expresión de las 3 proteínas se induce como respuesta a estrés abiótico, con lo que se esperaba que respondieran a baja temperatura.

- A su vez, los niveles de las 3 proteínas incrementan en frutos tratados (menos daño por frío) con respecto a frutos control (más daño por frío).

Estas proteínas se inducen en respuesta a estrés. Además, Taumatina y Quitinasa están involucradas en la adquisición de resistencia a estrés abiótico y de Bet v I se ha sugerido un papel protector. Estos resultados sugieren que la aplicación del tratamiento incrementa la tolerancia al frío de los frutos sometidos a baja temperatura.

P89, P986 Y P1303-1312 podrían utilizarse por tanto, como marcadores moleculares de tolerancia al frío en programas de mejora genética de variedades de melocotón.

En resumen

Existe un efecto de la FRIGOCONSERVACIÓN en la expresión de proteínas diferenciales en la variedad sensible a daño por frío “Elegant Lady”.

- EFECTO POSITIVO DE LA FRIGOCONSERVACIÓN

- Melocotones conservados durante cuatro semanas sobreexpresan **proteínas relacionadas con la maduración** (P600-601-835: ACO4, P943: cistein proteasa).
- Melocotones expuestos a frío durante cuatro semanas sobreexpresan **proteínas termotolerantes** (P1093: lipocalina, P1345: HSPs, P335: GABA-T).
- Melocotones expuestos a frío durante cuatro semanas sobreexpresan **proteínas de protección frente a estrés oxidativo** (P631: alcohol deshidrogenasa y P1103: benzoquinona reductasa)

- EFECTO NEGATIVO DE LA FRIGOCONSERVACIÓN

- Melocotones que sufren daño por frío inhiben la expresión de algunas **proteínas que protegen contra daño oxidativo** (P284: catalasa).

Existe un efecto del TRATAMIENTO POSTCOSECHA (ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO) en la expresión de proteínas diferenciales en la variedad “Elegant Lady”.

- EFECTO POSITIVO DEL ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO

- Melocotones tratados (DS) sobreexpresan un mayor número de **proteínas termotolerantes** que melocotones no tratados(C); (P1093 lipocalina, P1345 smHSPs, P89 taumatina y P981 quitinasa A vs P1093 lipocalina, P1345 smHSPs).
- Melocotones tratados (DS) mantienen su jugosidad y no sobreexpresan proteínas de estrés por deshidratación (P216 dehidrinas).

- EFECTO “NEGATIVO” DEL ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO

- Melocotones tratados aceleran su maduración y por lo tanto sobreexpresan proteínas relacionadas con este procesos (P600-601-835 ACO4)

No existe un efecto de la TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN en la expresión de proteínas diferenciales en la variedad “Elegant Lady”.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La sensibilidad al desarrollo de daños por frío presenta un fuerte componente varietal, encontrando variedades resistentes al desarrollo de fisiopatías como “Royal Glory”, variedades sensibles como “Ruby Rich” y “Sum 67”, y variedades muy sensibles como “Elegant Lady” y “Alejandro Dumas”.
2. La utilización del protocolo de premaduración a 20°C puede ser una estrategia eficaz para disminuir el desarrollo de fisiopatías, así como incrementar la vida útil en algunos cultivares como “Royal Glory” y “Sum 67”, siendo muy variable su eficacia entre variedades. El protocolo de premaduración utilizado fue muy eficaz en disminuir la “harinosidad” desarrollada en los frutos de “Ruby Rich” y “Elegant Lady” conservados a 5°C, así como el desarrollo de la “pulpa seca” de los frutos de “Royal glory”, “Sum 67” y “Alejandro Dumas” conservados a 0°C.
3. “Elegant Lady”, a pesar de ser una variedad altamente sensible al daño por frío, presenta mayor variedad y cantidad de compuestos volátiles y una marcada evolución cuantitativa y cualitativa durante su conservación. Sin embargo, “Royal Glory”, parece ser una variedad más estable, con menor riqueza y cantidad de volátiles.
4. La maduración tras frigoconservación de la variedad “Elegant Lady” va asociada a un incremento en la emisión de cetonas en todas las condiciones ensayadas, principalmente en frutos sometidos a acondicionamiento térmico. En “Royal Glory” sin embargo las cetonas no están presentes en ningún momento de su conservación.
5. En ambas variedades la maduración tras frigoconservación está asociada a un descenso en niveles de terpenos (de notable presencia en el momento de la recolección).
6. En ambas variedades se observa también que la maduración tras frigoconservación está asociada a un incremento en los niveles de lactonas. Acompañadas del

incremento de alcoholes en el caso de "Royal Glory" y del incremento de ésteres en el caso de "Elegant Lady".

- En la variedad "Royal Glory" existe un marcado efecto de la temperatura de conservación sobre la emisión de lactonas, siendo los incrementos de emisión superiores a 5°C que a 0°C.

- En la variedad "Elegant Lady" también se observa un efecto de la temperatura de conservación pero a la vez existe un marcado efecto del tratamiento sobre la emisión de lactonas, siendo los incrementos de emisión superiores en frutos con acondicionamiento térmico que en frutos control.

7. La aplicación del protocolo de premaduración sí mejora la calidad organoléptica de estas variedades, incrementando los niveles de compuestos considerados indicadores de maduración como son los ésteres y de compuestos responsables del aroma a melocotón como son las lactonas.
8. La reducción de los niveles de la enzima catalasa2 (P284) con la frigoconservación del fruto podría ser una de las causas de la sensibilidad de la variedad "Elegant Lady" al daño por frío.
9. El acondicionamiento térmico mantienen la jugosidad de los frutos frigoconservados y reduce los niveles de la proteína de estrés por deshidratación P216 en la variedad sensible "Elegant Lady".
10. El acondicionamiento térmico incrementa los niveles de las proteínas termotolerantes P89 taumatina y P981 quitinasa y de la proteína P1303-1312 Bet vi respecto a frutos no tratados en la variedad sensible "Elegant lady".
11. Las proteínas P89 taumatina, P981 quitinasa, P1093 TIP, P1345 smHSP, P1303-1312 Bet vi podrían utilizarse como marcadores moleculares en programas de mejora genética de variedades de melocotón.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams-Phillips, L., Barry, C., & Giovannoni, J. (2004). Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science*, 9(7), 331–338. <http://doi.org/doi.org/10.1016/j.tplants.2004.05.004>
- Aghdam, M. S., Sevillano, L., Flores, F. B., & Bodbodak, S. (2013). Heat shock proteins as biochemical markers for postharvest chilling stress in fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*, 160, 54–64. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.020>
- Akoh, C. C., Min, D. B., & Min, D. B. (2002). *Food lipids : chemistry, nutrition, and biochemistry*. M. Dekker.
- Alba, R., Cordonnier-Pratt, M. M., & Pratt, L. H. (2000). Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiology*, 123(1), 363–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806253>
- Alexander, L. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2039–2055. <http://doi.org/10.1093/jxb/erf072>
- Al-Fageeh, M. B., & Smales, C. M. (2006). Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *The Biochemical Journal*, 397(2), 247–59. <http://doi.org/10.1042/BJ20060166>
- Alique, R., Zamorano, J. P., Calvo, L., Merodio, C., & De La Plaza, J. L. (1994). Tolerance of Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) to Cold Storage. *J. AMER. SOC. HORT. SCI*, 119(1193).
- Alique R. y Zamorano J.P. (2000). *Aplicación del frío a los alimentos*. (M. Lamúa, Ed.). Madrid, Ediciones Mundi Prensa.
- Allagulova, C. R., Gimalov, F. R., Shakirova, F. M., & Vakhitov, V. A. (2003). The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry. Biokhimiia*, 68(9), 945–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14606934>
- Atkinson, D. E., & Walton, G. M. (1967). Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 242(13), 3239–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6027798>
- Aubert, C., Günata, Z., Ambid, C., & Baumes, R. (2003). Changes in physicochemical characteristics and volatile constituents of yellow- and white-fleshed nectarines during maturation and artificial ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3083–91. <http://doi.org/10.1021/jf026153i>
- Aubert, C., & Milhet, C. (2007). Distribution of the volatile compounds in the different parts of a white-fleshed peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Food Chemistry*, 102(1), 375–384. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.030>
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Iturriaga, G. (2004). The Arabidopsis trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiology*, 136(3), 3649–59. <http://doi.org/10.1104/pp.104.052084>

- Azcón-Bieto, J., & Talóm, M. (2003). *Fundamentos de fisiología vegetal*.
- Bagnoli, F., Danti, S., Magherini, V., Cozza, R., Innocenti, A. M., & Racchi, M. L. (2004). Molecular cloning, characterisation and expression of two catalase genes from peach. *Functional Plant Biology*, 31(4), 349. <http://doi.org/10.1071/FP03203>
- Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and Salt Tolerance in Plants. <http://dx.doi.org/10.1080/07352680590910410>.
- Bassett, C. L., Wisniewski, M. E., Artlip, T. S., Richart, G., Norelli, J. L., & Farrell, R. E. (2009). Comparative expression and transcript initiation of three peach dehydrin genes. *Planta*, 230(1), 107–18. <http://doi.org/10.1007/s00425-009-0927-1>
- Bateman, A., Coghill, P., & Finn, R. D. (2010). DUFs: families in search of function. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(Pt 10), 1148–52. <http://doi.org/10.1107/S1744309110001685>
- Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., & Bhattarai, T. (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences*, 32(3), 501–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17536169>
- Bianco, L., Lopez, L., Scalone, A. G., Di Carli, M., Desiderio, A., Benvenuto, E., & Perrotta, G. (2009). Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes. *Journal of Proteomics*, 72(4), 586–607. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.11.019>
- Bleecker, A. B., & Kende, H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 1–18. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.1>
- Borsani, J., Budde, C. O., Porrini, L., Lauxmann, M. A., Lombardo, V. A., Murray, R., ... Lara, M. V. (2009). Carbon metabolism of peach fruit after harvest: changes in enzymes involved in organic acid and sugar level modifications. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1823–37. <http://doi.org/10.1093/jxb/erp055>
- Bouché, N., & Fromm, H. (2004a). GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science*, 9(3), 110–5. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.01.006>
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., & Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 140(2), 103–125. [http://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00218-0](http://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00218-0)
- Brown, D. J., & Beevers, H. (1987). Fatty Acids of Rice Coleoptiles in Air and Anoxia. *PLANT PHYSIOLOGY*, 84(2), 555–559. <http://doi.org/10.1104/pp.84.2.555>
- Brückner, B. (2008). Consumer acceptance of fruit and vegetables: The role of flavour and other quality attributes (pp. 11–17). <http://doi.org/10.1533/9781845694296.1.11>
- Bruhn, C. M., Feldman, N., Garlitz, C., Harwood, J., Ivans, E., Marshall, M., ... Williamson, E. (1991). Consumer perceptions of quality: apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries, and tomatoes. *Journal of Food Quality*, 14(3), 187–195. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1991.tb00060.x>
- Brummell, D. A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33(2), 103.

- <http://doi.org/10.1071/FP05234>
- Brummell, D. A., Dal Cin, V., Crisosto, C. H., & Labavitch, J. M. (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*, 55(405), 2029–39. <http://doi.org/10.1093/jxb/erh227>
- Brummell, D. A., Dal Cin, V., Lurie, S., Crisosto, C. H., & Labavitch, J. M. (2004). Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. *Journal of Experimental Botany*, 55(405), 2041–52. <http://doi.org/10.1093/jxb/erh228>
- Brummell, D. A., & Harpster, M. H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 47(1/2), 311–339. <http://doi.org/10.1023/A:1010656104304>
- Bugos, R. C., Hieber, A. D., & Yamamoto, H. Y. (1998). Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(25), 15321–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624110>
- Bustamante, C. A., Budde, C. O., Borsani, J., Lombardo, V. A., Lauxmann, M. A., Andreo, C. S., ... Drincovich, M. F. (2012). Heat treatment of peach fruit: modifications in the extracellular compartment and identification of novel extracellular proteins. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 60, 35–45. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.021>
- Buttery, R. G., & Ling, L. C. (1993). Volatile Components of Tomato Fruit and Plant Parts (pp. 23–34). <http://doi.org/10.1021/bk-1993-0525.ch003>
- Cano-Salazar, J. A. (2012). *Optimización de las tecnologías de conservación en diferentes variedades de melocotón y nectarina para la mejora de su calidad*. Lleida (ETSIA).
- Cano-Salazar, J., Echeverría, G., Crisosto, C. H., & Lopez, L. (2012). Cold-storage potential of four yellow-fleshed peach cultivars defined by their volatile compounds emissions, standard quality parameters, and consumer acceptance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1266–82. <http://doi.org/10.1021/jf204126m>
- Cano-Salazar, J., López, M. L., Crisosto, C. H., & Echeverría, G. (2013). Volatile compound emissions and sensory attributes of “Big Top” nectarine and “Early Rich” peach fruit in response to a pre-storage treatment before cold storage and subsequent shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*, 76, 152–162. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.10.001>
- Cánovas, F. M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H.-P., & Rossignol, M. (2004). Plant proteome analysis. *Proteomics*, 4(2), 285–98. <http://doi.org/10.1002/pmic.200300602>
- Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J. M., & Pascual-Montano, A. (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biology*, 8(1), R3. <http://doi.org/10.1186/gb-2007-8-1-r3>
- Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., & Panis, B. (2005). Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-

- dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5(10), 2497–507. <http://doi.org/10.1002/pmic.200401222>
- Casañal, A., Zander, U., Muñoz, C., Dupeux, F., Luque, I., Botella, M. A., ... Marquez, J. A. (2013). The strawberry pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a proteins control flavonoid biosynthesis by binding to metabolic intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(49), 35322–32. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.501528>
- Chan, Z. (2012). Proteomic responses of fruits to environmental stresses. *Frontiers in Plant Science*, 3, 311. <http://doi.org/10.3389/fpls.2012.00311>
- Chapman, G. W., Horvat, R. J., & Forbus, W. R. (1991). Physical and chemical changes during the maturation of peaches (cv. Majestic). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(5), 867–870. <http://doi.org/10.1021/jf00005a010>
- Chen, Z., Silva, H., & Klessig, D. F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5141), 1883–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8266079>
- Chevalier, F. (2010). Highlights on the capacities of “Gel-based” proteomics. *Proteome Science*, 8, 23. <http://doi.org/10.1186/1477-5956-8-23>
- Chi, W.-T., Fung, R. W. M., Liu, H.-C., Hsu, C.-C., & Charng, Y.-Y. (2009). Temperature-induced lipocalin is required for basal and acquired thermotolerance in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, 32(7), 917–27. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01972.x>
- Close, T. J. (1996). Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, 97(4), 795–803. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00546.x>
- Close, T. J. (1997). Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 291–296. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb04785.x>
- Close, T. J., Kortt, A. A., & Chandler, P. M. (1989). A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Molecular Biology*, 13(1), 95–108. <http://doi.org/10.1007/BF00027338>
- Crawford, R. M. M., & Braendle, R. (1996). Oxygen deprivation stress in a changing environment. *Journal of Experimental Botany*, 47(2), 145–159. <http://doi.org/10.1093/jxb/47.2.145>
- Crisosto, C.H., Crisosto, G. and Bowerman, E. (2003). Understanding consumer acceptance of peach, nectarine and plum cultivars. Retrieved February 19, 2016, from http://www.actahort.org/books/604/604_10.htm
- Crisosto, Carlos H; Slaughter, David; Garner, David; Boyd, J. (2001). Stone fruit critical bruising thresholds. *Journal of the American Pomological Society*.
- Crisosto, C. (2004). Controlled delayed cooling extends peach market life. *HORTTECHNOLOGY*, 14(1), 99–104. Retrieved from https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=9&SID=X1VuysLMmAZCWxK2Uqz&page=1&doc=6

- Crisosto, C. H. (1994). Stone fruit maturity indices: a descriptive review. *Postharvest News and Information*, 5(6), 65N–68N.
- Crisosto, C. H. (2002). How do we increase peach consumption?
- Crisosto, C. H., & Crisosto, G. M. (2005). Relationship between ripe soluble solids concentration (RSSC) and consumer acceptance of high and low acid melting flesh peach and nectarine (*Prunus persica* (L.) Batsch) cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 38(3), 239–246.
- Crisosto, C. H., & Labavitch, J. M. (2002). Developing a quantitative method to evaluate peach (*Prunus persica*) flesh mealiness. *Postharvest Biology and Technology*, 25(2), 151–158. [http://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00183-1](http://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00183-1)
- Crisosto, C. H., Mitchell, F. G., & Ju, Z. (1999). Susceptibility to Chilling Injury of Peach, Nectarine, and Plum Cultivars Grown in California. *HortScience*, 34(6), 1116–1118. Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/content/34/6/1116.short>
- Czerny, M., Christlbauer, M., Christlbauer, M., Fischer, A., Granvogl, M., Hammer, M., ... Schieberle, P. (2008). Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *European Food Research and Technology*, 228(2), 265–273. <http://doi.org/10.1007/s00217-008-0931-x>
- Dagar, A., Friedman, H., & Lurie, S. (2010). Thaumatin-like proteins and their possible role in protection against chilling injury in peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 57(2), 77–85. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.03.009>
- Dat, Humberto Lopez-Delgado, Christine H. Foyer, I. M. S., Lopez-Delgado, Foyer, & Scott. (1998). Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 116(4), 1351–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9536052>
- Dat, J. F., Foyer, C. H., & Scott, I. M. (1998). Changes in Salicylic Acid and Antioxidants during Induced Thermotolerance in Mustard Seedlings. *PLANT PHYSIOLOGY*, 118(4), 1455–1461. <http://doi.org/10.1104/pp.118.4.1455>
- Derail, C., Hofmann, T., & Schieberle, P. (1999). Differences in key odorants of handmade juice of yellow-flesh peaches (*Prunus persica* L.) induced by the workup procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4742–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10552883>
- Ding, C.-K., Wang, C. Y., Gross, K. C., & Smith, D. L. (2002). Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta*, 214(6), 895–901. <http://doi.org/10.1007/s00425-001-0698-9>
- Domsalla, A., & Melzig, M. F. (2008). Occurrence and properties of proteases in plant latices. *Planta Medica*, 74(7), 699–711. <http://doi.org/10.1055/s-2008-1074530>
- Dong, L., Zhou, H.-W., Sonogo, L., Lers, A., & Lurie, S. (2001). Ethylene involvement in the cold storage disorder of “Flavortop” nectarine. *Postharvest Biology and Technology*, 23, 105–115. [http://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00106-5](http://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00106-5)
- Drolet, G., Dumbroff, E. B., Legge, R. L., & Thompson, J. E. (1986). Radical scavenging properties of

- polyamines. *Phytochemistry*, 25(2), 367–371. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85482-5](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85482-5)
- Eastwood Leung, H.-C. (Ed.). (2012). *Integrative proteomics*.
- Echeverría-Zomeño, S., Yáñez, E., Fernández-Bautista, N., Castro-Sanz, A. B., Ferrando, A., & Castellano, M. M. (2013). Regulation of Translation Initiation under Biotic and Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4670–83. <http://doi.org/10.3390/ijms14034670>
- Engel, K. H., Flath, R. A., BATTERY, R. G., Mon, T. R., Rammig, D. W., & Teranishi, R. (1988). Investigation of volatile constituents in nectarines. 1. Analytical and sensory characterization of aroma components in some nectarine cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(3), 549–553. <http://doi.org/10.1021/jf00081a036>
- FAOSTAT. (2016). Retrieved from <http://faostat.fao.org/>
- Faurobert, Pelpoir, & Chaïb. (2006). Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, 335, 9–14. Retrieved from <http://prodinra.inra.fr/?locale=es#!ConsultNotice:12517>
- Fernandes, H., Michalska, K., Sikorski, M., & Jaskolski, M. (2013). Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *The FEBS Journal*, 280(5), 1169–99. <http://doi.org/10.1111/febs.12114>
- Fernández-Trujillo, J. P., Cano, A., & Artés, F. (1998). Physiological changes in peaches related to chilling injury and ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 13(2), 109–119. [http://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00006-4](http://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00006-4)
- Forthoffer, N., Gómez-Díaz, C., Bello, R. I., Burón, M. I., Martín, S. F., Rodríguez-Aguilera, J. C., ... Villalba, J. M. (2002). A novel plasma membrane quinone reductase and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 are upregulated by serum withdrawal in human promyelocytic HL-60 cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 34(3), 209–19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12171070>
- Giné-Bordonaba, J., Cantín, C. M., Echeverría, G., Ubach, D., & Larrigaudière, C. (2016). The effect of chilling injury-inducing storage conditions on quality and consumer acceptance of different *Prunus persica* cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 115, 38–47.
- Giovannoni, J. J. (2004). Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *THE PLANT CELL ONLINE*, 16(suppl_1), S170–S180. <http://doi.org/10.1105/tpc.019158>
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., ... Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1178–D1186. <http://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
- Graether, S. P., & Boddington, K. F. (2014). Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Frontiers in Plant Science*, 5, 576. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00576>
- Griffith, M., Lumb, C., Wiseman, S. B., Wisniewski, M., Johnson, R. W., & Marangoni, A. G. (2005). Antifreeze proteins modify the freezing process in planta. *Plant Physiology*, 138(1), 330–40. <http://doi.org/10.1104/pp.104.058628>
- Griffith, M., & Yaish, M. W. F. (2004). Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science*, 9(8), 399–405. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.06.007>

- Groenen, P. J. T. A., Merck, K. B., Jong, W. W., & Bloemendal, H. (1994). Structure and Modifications of the Junior Chaperone alpha-Crystallin. From Lens Transparency to Molecular Pathology. *European Journal of Biochemistry*, 225(1), 1–19. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00001.x>
- Guasco Herrera, C., Chávez Servín, J. L., Ferriz Martínez, R. A., de la Torre Carbot, K., Elton Puente, E., & García Gasca, T. (2014). Poliaminas: pequeños gigantes de la regulación metabólica. *REB. Revista de Educación Bioquímica*, 33(2), 51–57.
- Gutiérrez, A. M. (2015). *Composición de ácidos grasos y peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas aislados de hígado, corazón y cerebro de aves de diferentes especies: relación con el tamaño corporal*.
- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J., & Hinch, D. K. (2008). Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 132(2), 220–35. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00999.x>
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., & Masmoudi, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signaling & Behavior*, 6(10), 1503–9. <http://doi.org/10.4161/psb.6.10.17088>
- Hara, M. (2010). The multifunctionality of dehydrins: an overview. *Plant Signaling & Behavior*, 5(5), 503–8. <http://doi.org/10.4161/psb.11085>
- Hernández, M. L., Padilla, M. N., Sicardo, M. D., Mancha, M., & Martínez-Rivas, J. M. (2011). Effect of different environmental stresses on the expression of oleate desaturase genes and fatty acid composition in olive fruit. *Phytochemistry*, 72(2), 178–187. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.026>
- Hinch, D. K., Meins Jr, F., & Schmitt, J. M. (1997). [beta]-1,3-Glucanase Is Cryoprotective in Vitro and Is Accumulated in Leaves during Cold Acclimation. *Plant Physiology*, 114(3), 1077–1083. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223761>
- Hinterholzer, A., & Schieberle, P. (1998). Identification of the most odour-active volatiles in fresh, hand-extracted juice of Valencia late oranges by odour dilution techniques. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(1), 49–55. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199801/02\)13:1<49::AID-FFJ691>3.0.CO;2-S](http://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199801/02)13:1<49::AID-FFJ691>3.0.CO;2-S)
- Hiroyuki, K., & Terauchi, R. (2008). Regulation of expression of rice thaumatin-like protein: inducibility by elicitor requires promoter W-box elements. *Plant Cell Reports*, 27(9), 1521–8. <http://doi.org/10.1007/s00299-008-0536-7>
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604–611. <http://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Horvat, R. J., Chapman, G. W., Robertson, J. A., Meredith, F. I., Scorza, R., Callahan, A. M., & Morgens, P. (1990). Comparison of the volatile compounds from several commercial peach cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(1), 234–237. <http://doi.org/10.1021/jf00091a051>
- Hughes, M. A., Dunn, M. A., Pearce, R. S., White, A. J., & Zhang, L. (1992). An abscisic-acid-responsive,

- low temperature barley gene has homology with a maize phospholipid transfer protein. *Plant, Cell and Environment*, 15(7), 861–865. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1992.tb02155.x>
- Hundertmark, M., & Hinch, D. K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9, 118. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-9-118>
- Hurkman, W. J., & Tanaka, C. K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, 81(3), 802–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1075430&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Iglesias, I., & Echeverría, G. (2009). Differential effect of cultivar and harvest date on nectarine colour, quality and consumer acceptance. *Scientia Horticulturae*, 120(1), 41–50. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.09.011>
- Iglesias i Castellarnau, I., & Casals Pelegrí, E. R. (2014). Producción, exportación y consumo de melocotón en España. *Vida rural*. Eumedia. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4595413>
- Infante, R., Faruqi, M., & Meneses, C. (2008). Monitoring the sensorial quality and aroma through an electronic nose in peaches during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(12), 2073–2078. <http://doi.org/10.1002/jsfa.3316>
- Infante, R., Meneses, C., & Crisosto, C. H. (2009). Preconditioning treatment maintains taste characteristic perception of ripe “September Sun” peach following cold storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(5), 1011–1016. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01864.x>
- Isaacson, T., Damasceno, C. M. B., Saravanan, R. S., He, Y., Catalá, C., Saladié, M., & Rose, J. K. C. (2006). Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nature Protocols*, 1(2), 769–74. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.102>
- James, P. (1997). Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 30(4), 279–331. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634650>
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I., & Páldi, E. (1999). Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*, 208(2), 175–180. <http://doi.org/10.1007/s004250050547>
- Jin, P., Zheng, Y., Tang, S., Rui, H., & Wang, C. Y. (2009). A combination of hot air and methyl jasmonate vapor treatment alleviates chilling injury of peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 52(1), 24–29. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.09.011>
- Kader, A. A. (Ed.). (2007). *Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas* (3ª).
- Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I., & Tachibana, S. (2004). Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, 45(6),

- 712–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215506>
- Katari, M. S., Nowicki, S. D., Aceituno, F. F., Nero, D., Kelfer, J., Thompson, L. P., ... Gutiérrez, R. A. (2010). VirtualPlant: a software platform to support systems biology research. *Plant Physiology*, 152(2), 500–15. <http://doi.org/10.1104/pp.109.147025>
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1994). Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, 35(2), 225–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8069491>
- Knee, M. (2002). *Fruit quality its biological basis*. Sheffield Academic Press.
- Kovacs, D., Kalmar, E., Torok, Z., & Tompa, P. (2008). Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiology*, 147(1), 381–90. <http://doi.org/10.1104/pp.108.118208>
- Kuwabara, C., Takezawa, D., Shimada, T., Hamada, T., Fujikawa, S., & Arakawa, K. (2002). Absciscic acid- and cold-induced thaumatin-like protein in winter wheat has an antifungal activity against snow mould, *Microdochium nivale*. *Physiologia Plantarum*, 115(1), 101–110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010473>
- Lavilla, T., Recasens, I., & López, M. L. (2001). Production of volatile aromatic compounds in big top nectarines and royal glory peaches during maturity. *Acta Horticulturae*, (553), 233–234. <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.553.51>
- Lavilla, T., Recasens, I., Lopez, M., & Puy, J. (2002). Multivariate analysis of maturity stages, including quality and aroma, in “Royal Glory” peaches and “Big Top” nectarines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(15), 1842–1849. <http://doi.org/10.1002/jsfa.1268>
- Leng, P., Yuan, B., & Guo, Y. (2014). The role of absciscic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4577–88. <http://doi.org/10.1093/jxb/eru204>
- Linthorst, H. J. M., & Van Loon, L. C. (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(2), 123–150. <http://doi.org/10.1080/07352689109382309>
- Liu, J.-J., Ekramoddoullah, A. K. M., & Yu, X. (2003). Differential expression of multiple PR10 proteins in western white pine following wounding, fungal infection and cold-hardening. *Physiologia Plantarum*, 119(4), 544–553. <http://doi.org/10.1046/j.1399-3054.2003.00200.x>
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10(8), 1391–406. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9707537>
- López Gonzalez, G. (2002). *Guía de los árboles y arbustos de la Península Iberica y Baleares* (Mundi-Pren).
- Lorenzo, O., & Solano, R. (2005). Señalización de Ácido Jasmónico e interacciones con otras hormonas. *Biojournal.net*.

- Los, D. A., & Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1666(1), 142–157. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.002>
- Lurie, S., & Crisosto, C. H. (2005). Chilling injury in peach and nectarine. *Postharvest Biology and Technology*, 37(3), 195–208. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.04.012>
- Luza, J. G., van Gorsel, R., Polito, V. S., & Kader, A. A. (1992). Chilling Injury in Peaches: A Cytochemical and Ultrastructural Cell Wall Study. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117(1), 114–118. Retrieved from <http://journal.ashspublications.org/content/117/1/114.short>
- Lyons, J. M. (1973). Chilling Injury in Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 24(1), 445–466. <http://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.002305>
- Marangoni, A. G., Palma, T., & Stanley, D. W. (1996). Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biology and Technology*, 7(3), 193–217. [http://doi.org/10.1016/0925-5214\(95\)00042-9](http://doi.org/10.1016/0925-5214(95)00042-9)
- Martinez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M., Burlo, F., Carbonell, A., Burgos, L., & Riquelme, F. (2000). Exogenous Polyamines and Gibberellic Acid Effects on Peach (*Prunus persica* L.) Storability Improvement. *Journal of Food Science*, 65(2), 288–294. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15995.x>
- Meng, X., Han, J., Wang, Q., & Tian, S. (2009). Changes in physiology and quality of peach fruits treated by methyl jasmonate under low temperature stress. *Food Chemistry*, 114(3), 1028–1035. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.109>
- Meredith, F. I., Robertson, J. A., & Horvat, R. J. (1989). Changes in physical and chemical parameters associated with quality and postharvest ripening of Harvester peaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1210–1214. <http://doi.org/10.1021/jf00089a002>
- Møller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 561–591. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.561>
- Möller, W., Schipper, A., & Amons, R. (1987). A conserved amino acid sequence around Arg-68 of Artemia elongation factor 1 α is involved in the binding of guanine nucleotides and aminoacyl transfer RNAs. *Biochimie*, 69(9), 983–989. [http://doi.org/10.1016/0300-9084\(87\)90232-X](http://doi.org/10.1016/0300-9084(87)90232-X)
- Monroy, A. F., & Dhindsa, R. S. (1995). Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 degrees C. *The Plant Cell*, 7(3), 321–331. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7734966>
- Muccilli, V., Licciardello, C., Fontanini, D., Russo, M. P., Cunsolo, V., Saletti, R., ... Foti, S. (2009). Proteome analysis of Citrus sinensis L. (Osbeck) flesh at ripening time. *Journal of Proteomics*, 73(1), 134–152. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.09.005>
- Murayama, H., Arikawa, M., Sasaki, Y., Dal Cin, V., Mitsuhashi, W., & Toyomasu, T. (2009). Effect of ethylene treatment on expression of polyuronide-modifying genes and solubilization of polyuronides during ripening in two peach cultivars having different softening characteristics.

- Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 196–201.
<http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.003>
- Nanos, G., & Mitchell, F. (1991). High-temperature conditioning to delay internal breakdown development in peaches and nectarines. *HortScience*, 26(7), 882–885. Retrieved from https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=R2jJOMQ7BIHDE8fYZsQ&page=1&doc=1
- Navarro, S., Vazquez-Hernandez, M., Rosales, R., Sanchez-Ballesta, M. T., Merodio, C., & Escribano, M. I. (2015). Differential regulation of dehydrin expression and trehalose levels in Cardinal table grape skin by low temperature and high CO₂. *Journal of Plant Physiology*, 179, 1–11.
<http://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.02.007>
- Neta-Sharir, I., Isaacson, T., Lurie, S., & Weiss, D. (2005). Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *The Plant Cell*, 17(6), 1829–38. <http://doi.org/10.1105/tpc.105.031914>
- Neves, L. C., Campos, A. J. de, Prill, M. A. de S., & Roberto, S. R. (2013). Woolliness and leatheriness in late peach cultivars submitted to both delayed storage and to cold storage. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35(3). <http://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.13347>
- Nilo, R., Saffie, C., Lilley, K., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos-Vargas, R., ... Orellana, A. (2010). Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE). *BMC Genomics*, 11(1), 43. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-11-43>
- Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., ... Pascual-Montano, A. (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server issue), W317–22. <http://doi.org/10.1093/nar/gkp416>
- Nohzadeh Malakshah, S., Habibi Rezaei, M., Heidari, M., & Salekdeh, G. H. (2007). Proteomics reveals new salt responsive proteins associated with rice plasma membrane. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(9), 2144–54. <http://doi.org/10.1271/bbb.70027>
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E. T., & Welin, B. V. (2001). Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 45(3), 263–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292073>
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007–21. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2874754&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Obenland, D. M., Vensel, W. H., & Hurkman, W. J. (2008). Alterations in protein expression associated with the development of mealiness in peaches. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 83(1), 85–93.
- Ogundiwin, E. A., Martí, C., Forment, J., Pons, C., Granell, A., Gradziel, T. M., ... Crisosto, C. H. (2008). Development of ChillPeach genomic tools and identification of cold-responsive genes in peach

- fruit. *Plant Molecular Biology*, 68(4–5), 379–97. <http://doi.org/10.1007/s11103-008-9378-5>
- Ogundiwin, E. A., Peace, C. P., Nicolet, C. M., Rashbrook, V. K., Gradziel, T. M., Bliss, F. A., ... Crisosto, C. H. (2008). Leucoanthocyanidin dioxygenase gene (PpLDOX): a potential functional marker for cold storage browning in peach. *Tree Genetics & Genomes*, 4(3), 543–554. <http://doi.org/10.1007/s11295-007-0130-0>
- Ortiz, A., Echeverría, G., Graell, J., & Lara, I. (2009). Overall quality of “Rich Lady” peach fruit after air- or CA storage. The importance of volatile emission. *LWT - Food Science and Technology*, 42(9), 1520–1529. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.04.010>
- Ortiz, A., Graell, J., López, M. L., Echeverría, G., & Lara, I. (2010). Volatile ester-synthesising capacity in “Tardibelle” peach fruit in response to controlled atmosphere and 1-MCP treatment. *Food Chemistry*, 123(3), 698–704. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.037>
- Osorio, S., Alba, R., Nikoloski, Z., Kochevenko, A., Fernie, A. R., & Giovannoni, J. J. (2012). Integrative comparative analyses of transcript and metabolite profiles from pepper and tomato ripening and development stages uncovers species-specific patterns of network regulatory behavior. *Plant Physiology*, 159(4), 1713–29. <http://doi.org/10.1104/pp.112.199711>
- Osorio, S., Scossa, F., & Fernie, A. R. (2013). Molecular regulation of fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4, 198. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00198>
- Page, D., Gouble, B., Valot, B., Bouchet, J. P., Callot, C., Kretschmar, A., ... Faurobert, M. (2010). Protective proteins are differentially expressed in tomato genotypes differing for their tolerance to low-temperature storage. *Planta*, 232(2), 483–500. <http://doi.org/10.1007/s00425-010-1184-z>
- Palma, F., Carvajal, F., Jamilena, M., & Garrido, D. (2014). Contribution of polyamines and other related metabolites to the maintenance of zucchini fruit quality during cold storage. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 82, 161–71. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.001>
- Park, D. H., Mirabella, R., Bronstein, P. A., Preston, G. M., Haring, M. A., Lim, C. K., ... Schuurink, R. C. (2010). Mutations in γ -aminobutyric acid (GABA) transaminase genes in plants or *Pseudomonas syringae* reduce bacterial virulence. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 64(2), 318–30. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04327.x>
- Parker, D. et al. (1991). How quality relates to price in California fresh peach.
- Pavez, L., Hödar, C., Olivares, F., González, M., & Cambiazo, V. (2013). Effects of postharvest treatments on gene expression in *Prunus persica* fruit: Normal and altered ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 125–134. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.08.002>
- Pegoraro, C., Zanuzo, M. R., Chaves, F. C., Brackmann, A., Girardi, C. L., Lucchetta, L., ... Rombaldi, C. V. (2010). Physiological and molecular changes associated with prevention of woolliness in peach following pre-harvest application of gibberellic acid. *Postharvest Biology and Technology*, 57(1), 19–26. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.02.003>
- Peumans, W. J., Proost, P., Swennen, R. L., & Van Damme, E. J. M. (2002). The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage

- protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiology*, 130(2), 1063–72. <http://doi.org/10.1104/pp.006551>
- Pinhero, R. G., Paliyath, G., Yada, R. Y., & Murr, D. P. (1998). Modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling. Relation to chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(3), 213–224. [http://doi.org/10.1016/S0981-9428\(97\)86878-7](http://doi.org/10.1016/S0981-9428(97)86878-7)
- Qin, G., Meng, X., Wang, Q., & Tian, S. (2009). Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: a redox proteomics analysis. *Journal of Proteome Research*, 8(5), 2449–62. <http://doi.org/10.1021/pr801046m>
- Raffo, A., Nardo, N., Tabilio, M. R., & Paoletti, F. (2008). Effects of cold storage on aroma compounds of white- and yellow-fleshed peaches. *European Food Research and Technology*, 226(6), 1503–1512. <http://doi.org/10.1007/s00217-007-0682-0>
- Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Xu, B., Bose, J., Kaur, S., Conn, V., ... Gillham, M. (2015). GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nature Communications*, 6, 7879. <http://doi.org/10.1038/ncomms8879>
- Ravanel, S., Gakière, B., Job, D., & Douce, R. (1998). The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7805–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9636232>
- Renaut, J., Hausman, J.-F., & Wisniewski, M. E. (2006). Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. *Physiologia Plantarum*, 126(1), 97–109. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00617.x>
- Richard, S., Morency, M. J., Drevet, C., Jouanin, L., & Séguin, A. (2000). Isolation and characterization of a dehydrin gene from whspruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Molecular Biology*, 43(1), 1–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10949369>
- Ringnér, M. (2008). What is principal component analysis? *Nature Biotechnology*, 26(3), 303–4. <http://doi.org/10.1038/nbt0308-303>
- Rizzolo, A., Zerbini, P., Grassi, M., Cambiaghi, P., & Bianchi, G. (2006). Effect of 1-methylcyclopropene on aroma compounds in “Big top” nectarines after shelf life. *Journal of Food Quality*, 29(2), 184–202. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2006.00066.x>
- Roberts, M. R. (2007). Does GABA Act as a Signal in Plants?: Hints from Molecular Studies. *Plant Signaling & Behavior*, 2(5), 408–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2634229&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Robertson, J. A., Meredith, F. I., Horvat, R. J., & Senter, S. D. (1990). Effect of cold storage and maturity on the physical and chemical characteristics and volatile constituents of peaches (cv. Cresthaven). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 620–624. <http://doi.org/10.1021/jf00093a008>
- Ruelland, E., Vaultier, M.-N., Zachowski, A., & Hurry, V. (2009). Chapter 2 Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants. *Advances in Botanical Research*, 49, 35–150. <http://doi.org/10.1016/S0065->

- Salazar Iribe, A., & Gamboa de Buen, A. (2013). Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal. *REB. Revista de Educación Bioquímica*, 32(2), 67–75.
- Salunkhe, D. K., & Desai, B. B. (1984). *Postharvest biotechnology of fruits, Volumen 1*. Retrieved from https://books.google.es/books/about/Postharvest_biotechnology_of_fruits.html?id=9jAjqAAMA-AJ&pgis=1
- Sanchez-Bel, P., Egea, I., Sanchez-Ballesta, M. T., Sevillano, L., Del Carmen Bolarin, M., & Flores, F. B. (2012). Proteome Changes in Tomato Fruits Prior to Visible Symptoms of Chilling Injury are Linked to Defensive Mechanisms, Uncoupling of Photosynthetic Processes and Protein Degradation Machinery. *Plant & Cell Physiology*, 53(2), 470–84. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcr191>
- Sauter, M., Moffatt, B., Saechao, M. C., Hell, R., Wirtz, M., Bleecker, A. B., ... Hanson, A. D. (2013). Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *The Biochemical Journal*, 451(2), 145–54. <http://doi.org/10.1042/BJ20121744>
- Schenk, M. F., Cordewener, J. H., America, A. H., van't Westende, W. P., Smulders, M. J., Gilissen, L. J., ... America, A. (2009). Characterization of PR-10 genes from eight Betula species and detection of Bet v 1 isoforms in birch pollen. *BMC Plant Biology*, 9(1), 24. <http://doi.org/10.1186/1471-2229-9-24>
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54(4), 712–732. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2008.03446.x>
- Serrano, M., Martinez-Madrid, M. C., Martinez, G., Riquelme, F., Pretel, M. T., & Romojaro, F. (1996a). Review : Role of polyamines in chilling injury of fruit and vegetables/Revision: El papel de las poliaminas en los danos por frio de frutas y hortalizas. *Food Science and Technology International*, 2(4), 195–199. <http://doi.org/10.1177/108201329600200401>
- Sevillano, L., Sanchez-Ballesta, M. T., Romojaro, F., & Flores, F. B. (2009). Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(4), 555–573. <http://doi.org/10.1002/jsfa.3468>
- Sharom, M., Willemot, C., & Thompson, J. E. (1994). Chilling Injury Induces Lipid Phase Changes in Membranes of Tomato Fruit. *Plant Physiology*, 105(1), 305–308. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12232203>
- Shulaev, V., Silverman, P., & Raskin, I. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, 385(6618), 718–721. <http://doi.org/10.1038/385718a0>
- Spencer, M. D., Pangborn, R. M., & Jennings, W. G. (1978). Gas chromatographic and sensory analysis of volatiles from cling peaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 725–732. <http://doi.org/10.1021/jf60217a052>
- Su, Y., Xu, L., Fu, Z., Yang, Y., Guo, J., Wang, S., & Que, Y. (2014). ScChi, encoding an acidic class III chitinase of sugarcane, confers positive responses to biotic and abiotic stresses in sugarcane. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 2738–60. <http://doi.org/10.3390/ijms15022738>

- Sumitani, H., Suekane, S., Nakatani, A., & Tatsuka, K. (1994). Changes In Composition of Volatile Compounds in High Pressure Treated Peach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3), 785–790. <http://doi.org/10.1021/jf00039a037>
- Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R., & Pascual-Montano, A. (2012). GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(Web Server issue), W478-83. <http://doi.org/10.1093/nar/gks402>
- Taira, T., Toma, N., Ichi, M., Takeuchi, M., & Ishihara, M. (2005). Tissue distribution, synthesis stage, and ethylene induction of pineapple (*Ananas comosus*) chitinases. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(4), 852–4. <http://doi.org/10.1271/bbb.69.852>
- Takenaka, Y., Nakano, S., Tamoi, M., Sakuda, S., & Fukamizo, T. (2009). Chitinase gene expression in response to environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*: chitinase inhibitor allosamidin enhances stress tolerance. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(5), 1066–71. <http://doi.org/10.1271/bbb.80837>
- Taşg n, E., At c ,  ., & Nalbanto lu, B. (2003). Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, 41(3), 231–236. <http://doi.org/10.1023/B:GROW.0000007504.41476.c2>
- Thomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 571–599. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.571>
- Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R, G. A. (1990). Polyamine metabolism. In P. K. (Paul K. Stumpf, E. E. Conn, B. J. Mifflin, & P. J. Lea (Eds.), *The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise, Intermediary Nitrogen Metabolism*, Vol 16 (p. 402). New York: Academic Press.
- Timperio, A. M., Egidio, M. G., & Zolla, L. (2008). Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, 71(4), 391–411. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.07.005>
- Tomas-Barberan, F. A., & Robins, R. J. (1997). *Phytochemistry of fruit and vegetables*. Clarendon Press.
- Trainotti, L., Pavanello, A., & Zanin, D. (2006). PpEG4 is a peach endo-beta-1,4-glucanase gene whose expression in climacteric peaches does not follow a climacteric pattern. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 589–98. <http://doi.org/10.1093/jxb/erj043>
- Trainotti, L., Tadiello, A., & Casadoro, G. (2007). The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *Journal of Experimental Botany*, 58(12), 3299–308. <http://doi.org/10.1093/jxb/erm178>
- Unl , M., Morgan, M. E., & Minden, J. S. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 18(11), 2071–7. <http://doi.org/10.1002/elps.1150181133>
- Valliyodan, B., & Nguyen, H. T. (2006). Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(2), 189–195.

- <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.01.019>
- Veltmann, R. H., & Peppelenbos, H. W. (2003). A proposed mechanism behind the development of internal browning in pears (*Pyrus communis* cv conference). *Acta Horticulturae*, (600), 247–255. <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.600.32>
- Visai, C., & Vanoli, M. (1997). Volatile compound production during growth and ripening of peaches and nectarines. *Scientia Horticulturae*, 70(1), 15–24. [http://doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00032-0](http://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00032-0)
- Wang, C. Y. (1987). Changes of polyamines and ethylene in cucumber seedlings in response to chilling stress. *Physiologia Plantarum*, 69(2), 253–257. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb04283.x>
- Wang, L., Chen, S., Kong, W., Li, S., & Archbold, D. D. (2006). Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 41(3), 244–251. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.04.010>
- Wang, Y., Yang, C., Li, S., Yang, L., Wang, Y., Zhao, J., & Jiang, Q. (2009). Volatile characteristics of 50 peaches and nectarines evaluated by HP–SPME with GC–MS. *Food Chemistry*, 116(1), 356–364. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.004>
- Wang, Y.-S., Tian, S.-P., & Xu, Y. (2005). Effects of high oxygen concentration on pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruits during postharvest periods. *Food Chemistry*, 91(1), 99–104. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.053>
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., ... Ryals, J. A. (1991). Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, 3(10), 1085–1094. <http://doi.org/10.1105/tpc.3.10.1085>
- Watanabe, T., Kobori, K., Miyashita, K., Fujii, T., Sakai, H., Uchida, M., & Tanaka, H. (1993). Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 18567–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8103047>
- White, A. J., Alison Dunn, M., Brown, K., & Hughes, M. A. (1994). Comparative analysis of genomic sequence and expression of a lipid transfer protein gene family in winter barley. *Journal of Experimental Botany*, 45(12), 1885–1892. <http://doi.org/10.1093/jxb/45.12.1885>
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., ... Hochstrasser, D. F. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 14(1), 61–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9636313>
- Wisniewski, M. (2003). An overview of cold hardiness in woody plants: seeing the forest through the trees. *HortScience. HortScience August 2003 Vol. 38 No. 5*, 38(5), 952–959.
- Wisniewski, M., Bassett, C., & Arora, R. (2004). Distribution and partial characterization of seasonally expressed proteins in different aged shoots and roots of “Loring” peach (*Prunus persica*). *Tree Physiology*, 24(3), 339–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704143>

- Wisniewski, M. E., Bassett, C. L., Renaut, J., Farrell, R., Tworowski, T., & Artlip, T. S. (2006). Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit. *Tree Physiology*, 26(5), 575–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452071>
- Y. Wang, S., & L. Steffens, G. (1985). Effect of paclobutrazol on water stress-induced ethylene biosynthesis and polyamine accumulation in apple seedling leaves. *Phytochemistry*, 24(10), 2185–2190. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83007-1](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83007-1)
- Yamauchi, Y., Hasegawa, A., Mizutani, M., & Sugimoto, Y. (2012). Chloroplastic NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase contributes to the detoxification of reactive carbonyls produced under oxidative stress. *FEBS Letters*, 586(8), 1208–13. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.013>
- Yamauchi, Y., Hasegawa, A., Taninaka, A., Mizutani, M., & Sugimoto, Y. (2011). NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 6999–7009. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.202226>
- Yang, A., Cao, S., Yang, Z., Cai, Y., & Zheng, Y. (2011). γ -Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and activates the defence response of peach fruit. *Food Chemistry*, 129(4), 1619–1622. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.018>
- Yang, S. F., & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 155–189. <http://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001103>
- Yang, Y., He, M., Zhu, Z., Li, S., Xu, Y., Zhang, C., ... Wang, Y. (2012). Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biology*, 12, 140. <http://doi.org/10.1186/1471-2229-12-140>
- Yeh, S., Moffatt, B. A., Griffith, M., Xiong, F., Yang, D. S., Wiseman, S. B., ... Lajoie, G. (2000). Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiology*, 124(3), 1251–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11080301>
- Yoshikawa, H., Honda, C., & Kondo, S. (2007). Effect of low-temperature stress on abscisic acid, jasmonates, and polyamines in apples. *Plant Growth Regulation*, 52(3), 199–206. <http://doi.org/10.1007/s10725-007-9190-2>
- Yu, X. M., Griffith, M., & Wiseman, S. B. (2001). Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. *Plant Physiology*, 126(3), 1232–40. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=116479&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Zhang, B., Shen, J.-Y., Wei, W.-W., Xi, W.-P., Xu, C.-J., Ferguson, I., & Chen, K. (2010). Expression of genes associated with aroma formation derived from the fatty acid pathway during peach fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6157–65. <http://doi.org/10.1021/jf100172e>
- Zhang, B., Xi, W., Wei, W., Shen, J., Ferguson, I., & Chen, K. (2011). Changes in aroma-related volatiles and gene expression during low temperature storage and subsequent shelf-life of peach fruit.

Postharvest Biology and Technology, 60(1), 7–16.
<http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.09.012>

Zhang, C., Ding, Z., Xu, X., Wang, Q., Qin, G., & Tian, S. (2010). Crucial roles of membrane stability and its related proteins in the tolerance of peach fruit to chilling injury. *Amino Acids*, 39(1), 181–94.
<http://doi.org/10.1007/s00726-009-0397-6>

Zhang, Z., Pang, X., Ji, Z., & Jiang, Y. (2001). Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. *Food Chemistry*, 75(2), 217–221. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00202-3](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00202-3)

Zhang, Z., Pang, X., Xuewu, D., Ji, Z., & Jiang, Y. (2005). Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry*, 90(1–2), 47–52.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.023>

Zhou, H. W., Dong, L., Ben-Arie, R., & Lurie, S. (2001). The role of ethylene in the prevention of chilling injury in nectarines. *Journal of Plant Physiology*, 158(1), 55–61.

Zhou, H.-W., Lurie, S., Lers, A., Khatchitski, A., Sonogo, L., & Ben Arie, R. (2000). Delayed storage and controlled atmosphere storage of nectarines: two strategies to prevent woolliness. *Postharvest Biology and Technology*, 18(2), 133–141. [http://doi.org/10.1016/S0925-5214\(99\)00072-1](http://doi.org/10.1016/S0925-5214(99)00072-1)

8. ANEXOS

Los Anexos 1, 2, 3, 8, 9 y 10 se encuentran en formatos PDF y TIFF disponibles sólo en formato digital para permitir ampliar el tamaño de lo ya expuesto en la mayoría de los casos.

ANEXO 1.

Índices de calidad de las cinco variedades de estudio, en el momento de su recolección.

ANEXO 2-1, 2-2, 2-3, 2-4 Y 2-5.

Parámetros estándar de calidad en las cinco variedades de estudio, tras frigoconservación a 0 y 5°C, (DS) y sin (C) retraso en el almacenamiento frigorífico.

ANEXO 3-1 Y 3-2.

Emisión de volátiles (ng/kg fw) en “Elegant Lady” y “Royal glory”, tras frigoconservación a 0 y 5°C, con (DS) y sin (C) retraso en el almacenamiento frigorífico.

ANEXO 8.

Categorías funcionales a nivel de procesos biológicos de las POI.

ANEXO 9.

Mapa de procesos biológicos de las POI (*comparison chart*) de la plataforma Quick GO (Gene Ontology).

ANEXO 10.

Tabla con las comparaciones de interés significativas entre las distintas condiciones ensayadas.

ANEXO 4

Tablas de comparaciones entre condiciones de interés en el ensayo.**Módulo BVA (Biological Variation Analysis) del software DeCyder**

Master nº: nº de spot dentro del gel master

appearance: número de geles en los que fue detectada esta proteína (respecto de un total de 30 geles)

T-test: el valor p del test t de Student [$p \leq 0,05$ ($5,0 \times 10^{-2}$)]av. Ratio: media ($> \pm 1.5$)1-ANOVA: el valor p del test de ANOVA [$p \leq 0,05$ ($5,0 \times 10^{-2}$)]**Protein Table T-test and Av.Ratio: C0, C5, DS0, DS5 / Ini**

Pos.	Master No.	Appearance	T-test	Av. Ratio	1-ANOVA
1	42	30 (30)	0,00019	1,88	0,00043
2	59	30 (30)	2,40E-05	1,74	2,10E-05
3	61	27 (30)	0,00054	-2,1	0,00073
4	65	30 (30)	4,10E-05	-1,93	1,10E-05
5	68	27 (30)	1,30E-05	-2,02	2,40E-05
6	89	30 (30)	0,0073	1,82	4,00E-05
7	90	30 (30)	8,10E-06	3,01	1,10E-07
8	216	30 (30)	7,30E-05	10,53	1,70E-08
9	278	30 (30)	2,20E-05	-1,7	1,10E-05
10	284	30 (30)	9,30E-06	-1,89	2,30E-06
11	322	30 (30)	8,10E-06	-1,73	0,00015
12	335	30 (30)	9,30E-06	2,3	5,40E-05
13	440	30 (30)	0,035	2,29	1,10E-07
14	601	30 (30)	0,008	3,54	1,10E-07
15	631	30 (30)	0,0043	1,55	0,00043
16	671	27 (30)	0,0007	-1,6	0,015
17	891	30 (30)	0,00018	4,12	0,00022
18	981	30 (30)	0,00034	3,92	7,70E-08
19	1093	30 (30)	0,00032	1,55	0,0023
20	1303	30 (30)	0,00037	2,75	0,00038
21	1312	30 (30)	0,00032	3,18	1,70E-08
22	1345	27 (30)	0,033	1,59	0,013

Protein Table T-test and Av.Ratio: C0, C5 / Ini

Pos.	Master No.	Appearance	T-test	Av. Ratio	1-ANOVA
1	42	30 (30)	0,0099	1,67	0,00043
2	59	30 (30)	0,0026	1,68	2,10E-05
3	65	30 (30)	0,0064	-1,75	1,10E-05
4	68	27 (30)	0,0029	-1,88	2,40E-05
5	90	30 (30)	1,20E-05	2,49	1,10E-07
6	205	30 (30)	0,0022	-1,52	0,00043
7	216	30 (30)	1,20E-05	15,77	1,70E-08
8	278	30 (30)	0,00053	-1,82	1,10E-05

9	284	30 (30)	1,20E-05	-2,12	2,30E-06
10	322	30 (30)	0,00076	-1,72	0,00015
11	335	30 (30)	0,00053	2,1	5,40E-05
12	601	30 (30)	0,021	1,98	1,10E-07
13	631	30 (30)	0,0018	1,75	0,00043
14	671	27 (30)	0,026	-1,56	0,015
15	891	30 (30)	0,011	2,92	0,00022
16	943	30 (30)	0,028	1,56	0,027
17	981	30 (30)	0,00022	2,49	7,70E-08
18	1303	30 (30)	0,013	2,16	0,00038
19	1312	30 (30)	0,00021	2,18	1,70E-08

Protein Table T-test and Av.Ratio: DS0, DS5 / Ini

Pos.	Master No.	Appearance	T-test	Av. Ratio	1-ANOVA
1	42	30 (30)	0,00021	2,09	0,00043
2	59	30 (30)	0,00026	1,8	2,10E-05
3	61	27 (30)	4,30E-05	-2,4	0,00073
4	65	30 (30)	1,80E-05	-2,15	1,10E-05
5	68	27 (30)	4,00E-05	-2,14	2,40E-05
6	89	30 (30)	7,60E-05	2,23	4,00E-05
7	90	30 (30)	1,90E-06	3,52	1,10E-07
8	216	30 (30)	2,10E-05	5,28	1,70E-08
9	278	30 (30)	9,60E-05	-1,59	1,10E-05
10	284	30 (30)	6,10E-05	-1,71	2,30E-06
11	322	30 (30)	0,00012	-1,74	0,00015
12	335	30 (30)	7,60E-05	2,5	5,40E-05
13	440	30 (30)	0,0003	3,16	1,10E-07
14	600	30 (30)	0,00017	3,32	0,00014
15	601	30 (30)	7,00E-06	5,1	1,10E-07
16	671	27 (30)	0,0061	-1,63	0,015
17	835	30 (30)	0,0018	1,75	3,40E-05
18	891	30 (30)	0,0003	5,31	0,00022
19	981	30 (30)	1,90E-06	5,34	7,70E-08
20	1093	30 (30)	0,001	1,64	0,0023
21	1103	30 (30)	0,0023	1,59	0,00071
22	1303	30 (30)	0,00016	3,34	0,00038
23	1312	30 (30)	1,90E-06	4,17	1,70E-08
24	1345	27 (30)	0,021	1,73	0,013

Protein Table T-test and Av.Ratio: C0, DS0 / Ini

Pos.	Master No.	Appearance	T-test	Av. Ratio	1-ANOVA
1	42	30 (30)	0,0072	1,86	0,00043
2	59	30 (30)	0,0012	1,77	2,10E-05
3	61	27 (30)	0,022	-1,96	0,00073

4	65	30 (30)	0,0065	-1,79	1,10E-05
5	68	27 (30)	0,0025	-1,96	2,40E-05
6	89	30 (30)	0,019	1,93	4,00E-05
7	90	30 (30)	0,0012	3,12	1,10E-07
8	216	30 (30)	0,0018	12,42	1,70E-08
9	278	30 (30)	0,002	-1,6	1,10E-05
10	284	30 (30)	0,0012	-1,86	2,30E-06
11	322	30 (30)	0,0015	-1,71	0,00015
12	335	30 (30)	0,0015	2,43	5,40E-05
13	601	30 (30)	0,044	3,29	1,10E-07
14	631	30 (30)	0,025	1,61	0,00043
15	671	27 (30)	0,022	-1,64	0,015
16	891	30 (30)	0,0081	4,36	0,00022
17	981	30 (30)	0,002	3,87	7,70E-08
18	1303	30 (30)	0,0081	2,88	0,00038
19	1312	30 (30)	0,0081	3,18	1,70E-08

Protein Table T-test and Av.Ratio: C5, DS5 / Ini

Pos.	Master No.	Appearance	T-test	Av. Ratio	1-ANOVA
1	42	30 (30)	0,0029	1,9	0,00043
2	59	30 (30)	0,0023	1,71	2,10E-05
3	61	27 (30)	0,00029	-2,25	0,00073
4	65	30 (30)	0,00015	-2,09	1,10E-05
5	68	27 (30)	0,00015	-2,08	2,40E-05
6	89	30 (30)	0,018	1,71	4,00E-05
7	90	30 (30)	0,00015	2,89	1,10E-07
8	216	30 (30)	0,0015	8,63	1,70E-08
9	278	30 (30)	0,00015	-1,82	1,10E-05
10	284	30 (30)	0,00035	-1,93	2,30E-06
11	322	30 (30)	0,00019	-1,74	0,00015
12	335	30 (30)	0,00019	2,17	5,40E-05
13	440	30 (30)	0,019	2,81	1,10E-07
14	600	30 (30)	0,029	2,46	0,00014
15	601	30 (30)	0,0023	3,8	1,10E-07
16	671	27 (30)	0,0079	-1,57	0,015
17	835	30 (30)	0,024	1,65	3,40E-05
18	891	30 (30)	0,0042	3,87	0,00022
19	981	30 (30)	0,0047	3,96	7,70E-08
20	1093	30 (30)	0,002	1,61	0,0023
21	1103	30 (30)	0,0073	1,53	0,00071
22	1303	30 (30)	0,0042	2,61	0,00038
23	1312	30 (30)	0,0015	3,17	1,70E-08
24	1345	27 (30)	0,019	1,9	0,013

Protein Table T-test and Av.Ratio: DS5 / C5

Master No.	Appearance	T-test	Av. Ratio	1-ANOVA
216	30 (30)	0,0093	-2,73	1,70E-08
440	30 (30)	0,0093	2,4	1,10E-07
891	30 (30)	0,034	1,69	0,00022
981	30 (30)	0,035	2,38	7,70E-08
1312	30 (30)	0,0093	1,75	1,70E-08

Protein Table T-test and Av.Ratio: DS0 / C0

Master No.	Appearance	T-test	Av. Ratio	1-ANOVA
89	30 (30)	0,041	1,67	4,00E-05
216	30 (30)	0,019	-3,19	1,70E-08
440	30 (30)	0,035	1,97	1,10E-07
600	30 (30)	0,022	3,3	0,00014
601	30 (30)	0,019	3,46	1,10E-07
981	30 (30)	0,023	1,93	7,70E-08
1312	30 (30)	0,019	2,1	1,70E-08

Protein Table T-test and Av.Ratio: DS0, DS5 / C0,C5

Master No.	Appearance	T-test	Av. Ratio	1-ANOVA
89	30 (30)	0,0018	1,57	4,00E-05
216	30 (30)	2,20E-05	-2,99	1,70E-08
440	30 (30)	0,0032	2,22	1,10E-07
555	24 (30)	0,028	-1,58	0,0047
600	30 (30)	0,0013	2,46	0,00014
601	30 (30)	0,00059	2,57	1,10E-07
891	30 (30)	0,00033	1,82	0,00022
981	30 (30)	2,20E-05	2,14	7,70E-08
1303	30 (30)	0,014	1,54	0,00038
1312	30 (30)	2,20E-05	1,91	1,70E-08

ANEXO 5.

Secuencia de péptidos obtenida por espectrometría de masas.**Péptidos coincidentes se muestran en negrita.**

Resultado de las búsquedas combinadas de huella peptídica y MS-MS (péptidos fragmentados) contra la base de datos NCBI con restricción taxonómica a *Viridiplantae*, contra la base de datos del TAIR (*Arabidopsis thaliana*) y contra la base de datos de PHYTOZOME con restricción a *Prunus persica*.

Spot 68

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|595817822](#) Score: 80 Expect: 0.018
hypothetical protein PRUPE_ppa001783mg [Prunus persica]

Nominal mass (M_r): 84901; Calculated pI value: 6.12
 NCBI BLAST search of [gi|595817822](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus persica](#)
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI
 Entrez:
[gi|462399797](#) from [Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 17%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MASHIVGYPR MGPKRELKFA LESFWDGKTS AEDLQKVAAD LRSSIWKQMA
51 DAGIKHIPSNTFSYYDHVLD TTALLGAVPP RYGWNNGEIG FDTYFSMARG
101 NASVPAMEMT KWFDNTNYHFI VPELGPDVNF SYASHKAVEE YKEAKALGVD
151 TIPVLVGPVS YLLLSKPAKG VEKSFSLLSL LGKIIPYKE VISELKAAGA
201 SWIQFDEPTL VMDLDSHKLQ AFTDAYSHLE STLSGLNVLI ETYFADVPAE
251 AFKTLTSLKG VTAYGFDLVR GTKTLDLIK EFPKGKYLFA GLVDGRNIWA
301 NDLSASLSTL QTLEGIVGKD KLVVSTSCSL LHTAVDLVNE TKLDQEIKSW
351 LAFAAQKIVE VNALAKALAG HKDEAFFSAN AAAQASRKSS PRVTNEAVQK
401 AAAALKGSDH RRATNVSARL DAQQKKLNLP ILPTTTIGSF PQTIELRRVR
451 REYKAKKISE EEYVKAIKEE ISNVVKLQEE LDIDVLVHGE PERNDMVEYF
501 GEQLSGFAFT VNGWVQSYGS RCVKPPIIYG DVSRPNPMTV FWSSAAQSMT
551 ARPMKGMTG PVTILNWSFV RNDQPRFETT YQIALAIKDE VEDLEKAGIN
601 VIQIDEAALR EGLPLRKSEQ AFYLDWAVHS FRITNCGVQD TTQIHTHMCY
651 SNFNDDIHSI IDMDADVITI ENSRSDEKLL SVFREGVKYG AGIGPGVYDI
701 HSPRIPSTEE IADRINKMLA VLETNILWVN PDCGLKTRKY TEVKPALSNL
751 VAAAKLLRTQ LASAK

```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT5G17920.2](#) | Symbols: ATCIMS | Cobalamin-independent synth... [1409](#)
 0.0

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.7G009200.3 ([ppa001783m.g](#)), 1547.0, 0.0

Spot 89

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|190613911](#) Score: **87** Expect: **0.0038**
putative allergen Pru p 2.01B [Prunus dulcis x Prunus persica]

Nominal mass (M_r): **26708**; Calculated pI value: **8.43**
NCBI BLAST search of [gi|190613911](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus dulcis x Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: **21%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1  MMKSQAALLG LTTLAILFFS GAHAAKITFT NKCSYTVWPG TLTGDQKPQL
51 SLTGFKLATG ISRSVDAPSP WSGRFFGRTR CSTDASGKFT CATADCGSGQ
101 VSCNGNGAAP PATLVEITIA SNGGQDFYDV SLVDGFNLPM SVAPQGGTGK
151 CKASTCPADI NKVCPAPLQV KGSDGSVIAC KSACLAFNQP KYCCTPPNDK
201 PETCPPTDYS KLFKTQCPQA YSYAYDDKSS TFTCSGRPDY LITFCP
```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT1G20030](#).2 | Symbols: | Pathogenesis-related thaumatin su... [276](#)
9e-75

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.3G144100.1 ([ppa010473m.g](#)), 474.2, 4.7E-170

Spot 205

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|222624297](#) Score: 105 Expect: 5.9e-005
hypothetical protein OsJ_09630 [Oryza sativa Japonica Group]

Nominal mass (M_r): **47454**; Calculated pI value: **9.28**

NCBI BLAST search of [gi|222624297](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Oryza sativa Japonica Group](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **10%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MGKEKTHINI VVIGHVDSGK STTTGHLIYK LGGIDKRVIE RFEKEAAEMN
51 KRSFKYAWVL DKLKAERERG ITIDIALWKF ETTKYCYCTVI DAPGHRDFIK
101 NMITGTSQAD CAVLIIDSTT GGFEAGISKD GQTREHALLA FTLGVKQMIC
151 CCNKMDATTP KYSKARYDEI VKEVSSYLKK VGYNPDKIPF VPISGFEGDN
201 MIERSTNLDW YKGPTLLEAL DQINEPKRPS DKPLRLPLQD VYKIGGIGTV
251 PVGRVETGVL KPGMVLSKEA LPGDNVGFNV KNVAVKDLKR GYVASNSKDD
301 PAKEAASFTS QVIIMNHPGQ IGNGYAPVLD CHTSHIAVKF AELVTKIDRR
351 SGKELEKEPK FLKNGDAGMV KMIPTKPMVV ETFSEYPPLG RFAVRDMRQT
401 VAVGVIKNVE KKDPTGAKVT KAAAKKK

```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT5G60390](#).3 | Symbols: | GTP binding Elongation factor Tu ... [823](#)
0.0

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.6G095200.1 ([ppa005718m.g](#)), 823.9, 0.0

Spot 216

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|595818358](#) Score: 180 Expect: 1.9e-012
hypothetical protein PRUPE_ppa005514mg [Prunus persica]

Nominal mass (M_r): 48200; Calculated pI value: 6.40
NCBI BLAST search of [gi|595818358](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus persica](#)
Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI
Entrez:
[gi|462399869](#) from [Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 30%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MAHFGSTPEP TKTDEYGNPV HHTTTGTGRT DEFGNPVQHG VADTGYGTGA
51 GYGTHTKPGV VEHHGVPVLV HSKDDQYSRD TQTTTGGYGG DGYTGGEHQE
101 KKGLLGQLQD KLPGGNKDGQ YSHDTQTTTG AYGGAGYTGG EHHEKKGIIG
151 QVKDKLPGGQ KDDQYCRDTH PTTGAYGGAG YTGGEDEHEK GIIGQVKDKL
201 PGGQKDDQYC RDTHTTGAY GGAGYTGGEH QEKKGIIGQV KDKLPGGQKD
251 DQYSHDTHKT TGAYGGAGYT GDDTREKKGG QKDDHYSHDT HPTTGAYGGA
301 GYTGDDTREK KGIIDQVKDK LPPGQKDDHY SHETHPTTGA YGGAGYTGDD
351 TREKKGVVEK VKEKLPGGQN VHPTTGPYGG GGAAGIGETR ERKGVGEKVK
401 EKLPGGHKDD QYLHDTHPTK PTSAAHGGVG HTGGEPQLHE KKGLIEKIKD
451 KLPGHNN
```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT1G20440](#).1 | Symbols: COR47, RD17, AtCOR47 | cold-regulate... [44](#)
2e-04

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.7G161100.1, 282.3, 1E-89

Spot 284

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|32526568](#) Score: 115 Expect: 5.9e-006
catalase [Prunus persica]

Nominal mass (M_r): 57289; Calculated pI value: 6.95

NCBI BLAST search of [gi|32526568](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 35%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MDPYKHRPSS AFDSPYWTTN AGAPVWNND S LTVGPRGPV LLEDYHLVEK
51 LATFDRERIP ERVVHARGAS AKGFFEVTHD ISQLTCADFL RAPGVQTPVI
101 VRFSTVIHER GSPETLRDPR GFAVKFYTRE GNFDLVGNNF PVFFVRDAMK
151 FPDAIRAFKP NPKSHIQETW RILDFFSHLP ESLHTFAFFY DDLGVPQDYR
201 HMEGSSVHAY TLISKAGKVH YVKFHWKPTC GVKCLEDEA IKVGGANHSH
251 ATKDLYDSIA AGNYPEWKLY IQTMDPDHED RFDPLDLT KTWPEDILPL
301 QPVGRLVLNK NIDNFFAENE QLAFNPAHVV PGIYYSDDKV LQTRIFAYSD
351 TQRHRLGPNY LQLPVNAPKC PHHNNHHEGF MNFMHRDEEV NYFPSRHDPV
401 RHAERYPIPS NILSGKREKC VIEKENNFKQ PGERYRSWAP DRQERFIRRW
451 VDALSDPRVT HEIRSIWISY WSQADKSLGQ KLLSRLNVRP SI

```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT4G35090](#).1 | Symbols: CAT2 | catalase 2 | chr4:16700937-16... [900](#)
0.0

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.5G011400.2 ([ppa004763m.g](#)), 1024.6, 0.0

Spot 322

MASCOT-NCBI
(coverage 1)

Match to: [gi|73762178](#) Score: **180** Expect: **1.9e-012**
type II SK2 dehydrin [Prunus persica]

Nominal mass (M_r): **28525**; Calculated pI value: **5.37**
NCBI BLAST search of [gi|73762178](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: **43%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 NKSQDRGYEG KAGEYEEGSG ARAAECGEIK DRGLFDLFGK KEAEKPQEEV
51 IVTEFEKVKV SDHEAPHPHH HEPESYKVEQ EEDKEKKHGS LLEKLHRSDS
101 SSSSSSDEEE GEGGEKKKKK KEKKGLKEKI CGDHDQKVED TAVPVEKIYE
151 EPTHEEKKEE EKKGFLEKIK EKLPGQQKP EEIPASYDDQ QCHAQHAEPA
201 EPAGVGCEPK EKKGILEKIK EKIPGYHPKT EEEKEAIKEK EKEKETSSY
```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT1G76180](#).2 | Symbols: ERD14 | Dehydrin family protein | ch... [49](#)
3e-06

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.1G356400.1 (ppa010326m.g), 222.2, 5.1E-71

Spot 335

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|571491745](#) Score: 85 Expect: 0.0055**PREDICTED: gamma aminobutyrate transaminase 3, chloroplastic-like isoform X2 [Glycine max]**Nominal mass (M_r): 53424; Calculated pI value: 7.18NCBI BLAST search of [gi|571491745](#) against nrUnformatted [sequence string](#) for pasting into other applicationsTaxonomy: [Glycine max](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 14%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MVKDSCFEFT GSYDNYKLKR YSFGESMFKG HSMLAPFTAG WQTDDLHPLV
51 IEKSEGSYVY DINGKKYLDA LAGLWATSLG GSEPRLVDAA IAQLKKLPFY
101 HSFWNRTTLP SLDLAKELLE MFTARKMGKA FFVNSGSEAN DTQVKLVWYY
151 NNALGRPDKK KFIARAKSYH GSTLIAASLS GLPALHQKFD LPAPFVLHTD
201 CPHYWRYHLP GETEEEFSTR LAKNLEQLIL KEGPETIAAF IAEPVMGAGG
251 VIVPPSTYFE KVQAVVKKYD ILFIADDEVIC AFGRLGTMFG CDKYNIKPDL
301 VSLAKALSSA YLPIGAVLVS PEISDVIHAQ SNKLGSFESHG FTYSGHAAAC
351 AVAIEALKIY KERNIVDQVN KIAPRFQDGI KAFSDSPIIG EIRGTGLILG
401 TEFTDNKSPN DFPPEWGVG AYFGAQCEKH GMLVRVAGDN IMMSPPYIIS
451 QGEVDELISI YGKALKETEK KVQELKSQRK

```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT3G22200](#).1 | Symbols: POP2, GABA-T, HER1 | Pyridoxal phosp... [798](#)
0.0

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.3G186500.1 (ppa004369m.g), 850.9, 0.0

Spot 555

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|596001396](#) Score: 149 Expect: 2.4e-009
hypothetical protein PRUPE_ppa007461mg [Prunus persica]

Nominal mass (M_r): 31658; Calculated pI value: 8.97
NCBI BLAST search of [gi|596001396](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus persica](#)
Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI
Entrez:
[gi|462414623](#) from [Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 32%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MYFSVAHGVH AVRL**LGNEASI** **SQTIK**VKPGS LYALTFGASR **TCAQEEVLRV**
51 SVPPQAGDLP LQTLYSSNGG DTYAWGFRAT SNVVK**VTFHN** **PGVQEDPACG**
101 **PLLDIAIAIKE** **LFPALPTRDN** LVRNPGFEEA PHRLFNSSHG VLLPPKQLDV
151 TSPLPGWIIIE SLKAVK**FIDS** **QHFNVVPGKG** AVELVAGRES AIAQVLRTVP
201 NK**IYDLSFVV** **GDAR**NGCHGS MMVEAFAGKD TLKVPFTSQG KGGFKAASLK
251 FKAASPRTRI TFYSSFYHTR **VDDYGALCGP** **ILDQVR**VYYPV A

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT3G08030](#).2 | Symbols: | Protein of unknown function, DUF6... [428](#)
e-120

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.2G017800.2 (ppa007461m.g), 564.3, 0.0

Spot 600

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|238769129](#) Score: **96** Expect: **0.00045**
1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase [Prunus mume]

Nominal mass (M_r): **34926**; Calculated pI value: **5.27**

NCBI BLAST search of [gi|238769129](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus mume](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **15%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MENFPIINLE GLNGEGRKAT MEKIKDACEN WGFFELVSHG IPTEFLDTVE
51  RLTKEHYRQC LEQRFKELVA SKGLEAVKTE VNDMDWESTF YLRHLPKSNI
101 SEVPDLEDQY RNMKEFALK LEKLAEQLLD LLCENLGLEQ GYLKKAFYGT
151 NGPTFGTKVS NYPPCPNPEL IKGLRAHTDA GGLILLFQDD KVSGLQLLKD
201 GQWIDVPPMR HSIVINLGDQ LEVITNGKYK SVEHRVIAQT DGTRMSIASF
251 YNPGSDAVIY PAPTLVEKEA EEKNQVYPEI RVRRLHEALC WPQVPAQRAA
301 IRGDE

```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT1G05010](#).1 | Symbols: EFE, ACO4, EAT1 | ethylene-forming e... [405](#)
e-113

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.3G209900.1 (ppa008791m.g), 521.5, 0.0

Spot 601

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|595938843](#) Score: 512 Expect: 1.2e-045
hypothetical protein PRUPE_ppa008791mg [Prunus persica]

Nominal mass (M_r): 36377; Calculated pI value: 5.20
NCBI BLAST search of [gi|595938843](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus persica](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI
Entrez:

[gi|7108577](#) from [Prunus persica](#)
[gi|16588828](#) from [Prunus persica](#)
[gi|452671](#) from [Prunus persica](#)
[gi|3510500](#) from [Prunus armeniaca](#)
[gi|33329720](#) from [Prunus persica](#)
[gi|462411848](#) from [Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 78%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1  MENFPIINLE  GLNGEGRKAT  MEKIKDACEN  WGFFELVSHG  IPTEFLDTVE
51 RLTKEHYRQC  LEQRFKELVA  SKGLEAVKTE  VNDMDWESTF  YLRHLPKSNI
101 SEVPDLEDQY  RNVMKEFALK  LEKLAEQLLD  LLCENLGLEQ  GYLKKAFYGT
151 NGPTFGTKVS  NYPPCPNPEL  IKGLRAHTDA  GGLILLFQDD  KVSGLQLLKD
201 GQWIDVPPMR  HSIVINLGDQ  LEVITNGKYK  SVEHRVIAQT  DGTRMSIASF
251 YNPGSDAVIY  PAPTLVEKEA  EEKNQVYPKF  VFEDYMKLYA  GLKFQPKEP
301 FEAMKAVETN  ISLGPIATA
```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT1G05010](#).1 | Symbols: EFE, ACO4, EAT1 | ethylene-forming e... [464](#)
e-131

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.3G209900.1 (ppa008791m.g), 605.1, 0.0

Spot 631

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|595938703](#) Score: 410 Expect: 1.9e-035
hypothetical protein PRUPE_ppa008712mg [Prunus persica]

Nominal mass (M_r): 34420; Calculated pI value: 5.43
 NCBI BLAST search of [gi|595938703](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus persica](#)
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI
 Entrez:
[gi|462411839](#) from [Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 45%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MAAALSDSIP SVNKAWVYSE YGQSADVLKF DPNVAVPEIK EDQVLIKVVA
51 ASLNPIDFKR MLGYFKEIDS PPPTVPGYDV AGVVVKVGSQ VTKFKVGDEV
101 YGDLNENALV NPKKFGSLAE YTASEERVLA LKPQNLSFVE AASLPLALET
151 AYEGLERTEF SAGKSILVLG GAGGVGTHVI QLAKHVFGAS KVAATASTKK
201 LDLLRSLGAD LAIDYTKDNF EDLPEKFDVV YDAVGQSDRA VKAVKENGKV
251 VTIFGSVTPP ALTFVLTSTG TILEKLKPYL ESGKVKPVLD PTSPYPFSKT
301 IEAFAYLETS RATGKVVVHP IP
  
```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT1G23740](#).1 | Symbols: | Oxidoreductase, zinc-binding dehy... [392](#)
 e-109

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.3G284400.1 (ppa008712m.g), 553.1, 0.0

Spot 835

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|238769129](#) Score: **96** Expect: **0.00045**
1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase [Prunus mume]

Nominal mass (M_r): **34926**; Calculated pI value: **5.27**
NCBI BLAST search of [gi|238769129](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus mume](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: **15%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1  MENFPIINLE  GLNGEGRKAT  MEKIKDACEN  WGFFELVSHG  IPTEFLDTVE
51  RLTKEHYRQC  LEQRFKELVA  SKGLEAVKTE  VNDMDWESTF  YLRHLPKSNI
101 SEVPDLEDQY  RNMKEFALK  LEKLAEQLLD  LLCENLGLEQ  GYLKKAFYGT
151 NGPTFGTKVS  NYPPCPNPEL  IKGLRAHTDA  GGLILLFQDD  KVSGLQLLKD
201 GQWIDVPPMR  HSIVINLGDQ  LEVITNGKYK  SVEHRVIAQT  DGTRMSIASF
251 YNPGSDAVIY  PAPTLVEKEA  EEKNQVYPEI  RVRRLHEALC  WPQVPAQRAA
301 IRGDE
```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT1G05010](#).1 | Symbols: EFE, ACO4, EAT1 | ethylene-forming e... [405](#)
e-113

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.3G209900.1 (ppa008791m.g), 521.5, 0.0

Spot 943

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|2677828](#) Score: 75 Expect: 0.059
cysteine protease [Prunus armeniaca]

Nominal mass (M_r): 39855; Calculated pI value: 6.41

NCBI BLAST search of [gi|2677828](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus armeniaca](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 21%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MARVTLVLSA ALVLVAISCG AAASSFDESN PIRLVSDGLR ELEQQVVQVL
51 GNSRRALHFA RFAHRYGKKY ESVEEMKLRY EIFSENKKLI RSTNKKGLPY
101 TLAVNRFADW SWEEFRRQRL GAAQNCSATT KGSHELTDV LPESKNWREE
151 GIVTPVKDQG HCGSCWTFST TGALEAAYVQ AFRKQISLSE QQLVDCAGAF
201 NNFGCHGGLP SQAFEYIKYN GGLDTEAAYP YVGTDGACKF SAENVGVQVL
251 DSVNITLGDE QELKHAVAFV RPSVVAFQVV KSFRIYKSGV YTS DTCGSSP
301 MDVNHAVLAV GYGEEGGVPF WLIKNSWGES WGDNGYFKME FGKNMCGVAT
351 CASYPIVA

```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT3G45310](#).1 | Symbols: | Cysteine proteinases superfamily ... [541](#)
e-154

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.7G198500.1 (ppa006924m.g), 670.6, 0.0

Spot 981

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|596014798](#) Score: 183 Expect: 9.4e-013
hypothetical protein PRUPE_ppa009328mg [Prunus persica]

Nominal mass (M_r): 31622; Calculated pI value: 4.94
NCBI BLAST search of [gi|596014798](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus persica](#)
Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI
Entrez:
[gi|462415213](#) from [Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 24%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1  MALSKTQASA LSLSLIIIS LCKSSQAGGI AIYWGQGSPS NEGSLADTCN
51  TGNVQFVNIA FLSTFGNGQT PVLNLAHCD PSTNGCTSLS TDIKACQAKN
101 IKVLLSIGGG AGSYSLTSAD DARQVADYLW NNFLGGQANS RPLGDAVLGD
151 IDFDIEAGGG QFWDELARSL SGRGSKVYLA AAPQCPFPDA HLDGAIKTGL
201 FDYVWVQFYN NPPCQFANNN AANLLSAWNQ WTSTEAKQVF LGLPAAPEAA
251 PSGGFIPADA LKSQVLPNIK SSPKYGGVML WSKQYDNGYS TSIKDSV
```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT5G24090](#).1 | Symbols: ATCHIA, CHIA | chitinase A | chr5:81... [340](#)
6e-94

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.2G305200.1 (ppa009328m.g), 530.4, 0.0

Spot 1093

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|595807582](#) Score: 217 Expect: 3.7e-016
hypothetical protein PRUPE_ppa012058mg [Prunus persica]

Nominal mass (M_r): 21450; Calculated pI value: 5.60
 NCBI BLAST search of [gi|595807582](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus persica](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI
 Entrez:

[gi|77744891](#) from [Prunus persica](#)
[gi|77744893](#) from [Prunus armeniaca](#)
[gi|462398165](#) from [Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 53%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MAKKTMDVVK GLDLQRYMGR **WYEIASFP**SR FQPKNGENTR ATYTLR**DDGT**
 51 **VNVLNETWSD** **GKRSSIEGTA** **YKADPSSEEA** **KLKVKFYVPP** FLPIIPVVG
 101 YWVLFIDEDY QYALIGQPSR **NYLWILSRQP** **RLDDEIYNQL** **VQRAKDEEYD**
 151 **VSKLHKTPQS** **ETPPEGEEGP** **KDTKGIWWFK** SLLGK

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT5G58070](#).1 | Symbols: ATTIL, TIL | temperature-induced lip... [299](#)
 7e-82

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.7G259600.1 (ppa012058m.g), 380.6, 3.1E-135

Spot 1103

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|595873978](#) Score: 395 Expect: 5.9e-034
hypothetical protein PRUPE_ppa011600mg [Prunus persica]

Nominal mass (M_r): 21722; Calculated pI value: 5.80
NCBI BLAST search of [gi|595873978](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus persica](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI
Entrez:

[gi|5031275](#) from [Prunus armeniaca](#)

[gi|462407933](#) from [Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 59%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MATK**VYIVYY** **SMYGHVEKLA** **EEILKGAASV** **EGVEAKLWQV** **AETLQDDVLG**
51 **KMGAPPKSEV** **PIISPNDLSE** **ADGLLFGFPT** **RFGMMAAQFK** **AFFDSTGGLW**
101 **RTQALAGKPA** **GIFYSTGSQG** **GGQETTALTA** **ITQLVHHGMV** **FVPIGYSFGA**
151 **GMFEMEQIKG** **GSPYGAGTYA** **GDGTRQPSEL** **ELQQAFHQGK** **YFAGIAKKLK**
201 GSTV

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT5G54500](#).1 | Symbols: FQR1 | flavodoxin-like quinone reduc... [338](#)
1e-93

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.4G031000.2 (ppa011600m.g), 384.8, 2.5E-136

Spot 1303

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|596288657](#) Score: 273 Expect: 9.4e-022
hypothetical protein PRUPE_ppa012646mg [Prunus persica]

Nominal mass (M_r): 17354; Calculated pI value: 4.98
 NCBI BLAST search of [gi|596288657](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus persica](#)
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI
 Entrez:
[gi|462422909](#) from [Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 36%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 **MGVFTYSDES TSVIPPPRLF KALVLEADTL IPKIAPQSVK SAEIVEGDGG**
 51 **VGTIKKISFG EGSYHSYVKH** QIDGLDKDNF VYNYSLVEGD ALSDKVEKIS
 101 YEIKLVSAD GGSVIKSTSN YHTKGDVEIK EEDVKAGKEK ATGLFKLIEN
 151 YLVANPDACN

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT1G24020](#).2 | Symbols: MLP423 | MLP-like protein 423 | chr1... [47](#)
 7e-06

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.1G127900.1 (ppa012646m.g), 320.1, 3.1E-112

Spot 1312

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|596288657](#) Score: **246** Expect: **4.7e-019**
hypothetical protein PRUPE_ppa012646mg [Prunus persica]

Nominal mass (M_r): **17354**; Calculated pI value: **4.98**
NCBI BLAST search of [gi|596288657](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus persica](#)
Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI
Entrez:
[gi|462422909](#) from [Prunus persica](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: **36%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 **MGVFTYSDES TSVIPPPRLF KALVLEADTL IPKIAPQSVK SAEIVEGDGG**
51 **VGTIKKISFG EGSYHSYVKH** QIDGLDKDNF VYNYSLVEGD ALSDKVEKIS
101 YEIKLVASAD GGSVIKSTSN YHTKGDVEIK EEDVKAGKEK ATGLFKLIEN
151 YLVANPDACN

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT1G24020](#).2 | Symbols: MLP423 | MLP-like protein 423 | chr1... [47](#)
7e-06

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.1G127900.1 (ppa012646m.g), 320.1, 3.1E-112

Spot 1345

MASCOT-NCBI

Match to: [gi|5257560](#) Score: **83** Expect: **0.0082**
cytosolic class II low molecular weight heat shock protein [Prunus dulcis]

Nominal mass (M_r): **17550**; Calculated pI value: **5.58**

NCBI BLAST search of [gi|5257560](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Prunus dulcis](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **31%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MDVRIAGLDS PLFSTLQHIM DFTDEPDKSF NAPTRTYVRD AKAMASTPAD
51 VKEYPNSYVF VVDMPGLKSG DIKVQVEDDN VLLITGERKR EEEKEGAKYV
101 RMERRVGKFM RKFVLPENAN VEAISAVCQD GVLTVTVEKL PPPEPKKSKT
151 IEVKIA

```

TAIR (ATG, nb, score, E value)

[AT5G12020](#).1 | Symbols: HSP17.6II | 17.6 kDa class II heat s... [155](#)
1e-38

PHYTOZOME (nb, score, E value)

Prupe.1G407300.1 (ppa011156m.g), 263.1, 7.6E-90

ANEXO 6.

Tabla con el pi y PM de cada spot y la accesión, score, coverage y nombre de cada proteína en cada una de las bases de datos consultadas.

ANEXO 6-1: NCBI

NCBI						
SPOT	MW	PI	score	coverage %	% ident (blast)	nombre
42						
59						
61						
65						
68	84901	6.12	80	1.7%	100%	hypothetical protein PRUPE_ppa001783mg [Prunus persica]
89	26708	8.48	87	2.1%	100%	putative allergen Pru p 2.018 [Prunus dulcis x Prunus persica]
90						
205	47454	9.28	105	1.0%	100%	OKI_09630 [Oryza sativa Japonica Group]
216	48200	6.40	180	3.0%	100%	hypothetical protein PRUPE_ppa005514mg [Prunus persica]
278						
284	57289	6.95	115	3.9%	100%	catalse [Prunus persica]
322	28525	5.97	180	4.9%	100%	type II 5C2 dehydrin [Prunus persica]
335	53424	7.18	85	1.4%	100%	gamma aminobutyrate transaminase 3, chloroplast-like isoform X2 [Glycine max]
440						
555	31658	8.97	149	3.2%	100%	hypothetical protein PRUPE_ppa007461mg [Prunus persica]
600	34926	5.27	96	1.9%	100%	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase [Prunus mume]
601	36377	5.20	512	7.8%	100%	hypothetical protein PRUPE_ppa008791mg [Prunus persica]
631	34420	5.48	410		100%	hypothetical protein PRUPE_ppa008712mg [Prunus persica]
671						
835	34926	5.27	96	1.9%	100%	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase [Prunus mume]
891						
943	39855	6.41	75	2.1%	100%	cysteine protease [Prunus americana]
981	31622	4.94	183	2.8%	100%	hypothetical protein PRUPE_ppa009328mg [Prunus persica]
1093	21450	5.60	217	5.9%	100%	hypothetical protein PRUPE_ppa012058mg [Prunus persica]
1108	21722	5.90	395	5.9%	100%	hypothetical protein PRUPE_ppa011600mg [Prunus persica]
1312	17354	4.98	246	3.6%	100%	hypothetical protein PRUPE_ppa012646mg [Prunus persica]
1308	17354	4.98	273	3.6%	100%	hypothetical protein PRUPE_ppa012646mg [Prunus persica]
1345	17550	5.58	83	3.1%	100%	cytosolic class III low molecular weight heat shock protein [Prunus dulcis]

ANEXO 6-2: TAIR

TAIR (<i>Arabidopsis thaliana</i>)				
SPOT	ATG	score	E value	nombre
42				
59				
61				
65				
68	AT5G17920	1409	0	ATCIMS, ATMETS, ATMS1, COBALAMIN-INDEPENDENT METHIONINE SYNTHASE, METHIONINE SYNTHESIS 1
89	AT1G20030	276	9,00E-75	XXXXXXXX
90				
205	AT5G60390	823	0	EF1ALPHA: GTP binding Elongation factor Tu family protein
216	AT1G20440	44	2,00E-04	ATCOR47, COLD-REGULATED 47, COR47, RD17
278				
284	AT4G35090	900	0	CAT2, CATALASE 2
322	AT1G76180	49	3,00E-06	EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION 14, ERD14
335	AT3G22200	798	0	GABA-T, GAMMA-AMINOBUTYRATE TRANSAMINASE, HERT, HEXENAL RESPONSE1, POLLEN-PISTIL INCOMPATIBILITY 2, POP2
440				
555	AT3G08030	428	1,00E-120	XXXXXX
600	AT1G05010	405	1,00E-113	ACOA, EAT1, EFE, ETHYLENE FORMING ENZYME, ETHYLENE-FORMING ENZYME
601	AT1G05010	464	1,00E-131	ACOA, EAT1, EFE, ETHYLENE FORMING ENZYME, ETHYLENE-FORMING ENZYME
631	AT1G23740	392	1,00E-109	ALKENAL/ONE OXIDOREDUCTASE, AOR
671				
835	AT1G05010	405	1,00E-113	ACOA, EAT1, EFE, ETHYLENE FORMING ENZYME, ETHYLENE-FORMING ENZYME
891				
943	AT3G45310	541	1,00E-154	XXXXXXXX
981	AT5G24090	340	6,00E-94	ATCHIA, CHIA, CHITINASE A
1093	AT5G58070	299	7,00E-82	ATTIL, TEMPERATURE-INDUCED UPOCALIN, TIL
1103	AT5G54500	338	1,00E-93	FLAVODOXIN-LIKE QUINONE REDUCTASE 1, FOR1
1312	AT1G24020	47	7,00E-06	MIP-LIKE PROTEIN 423, MIP423
1303	AT1G24020	47	7,00E-06	MIP-LIKE PROTEIN 423, MIP423
1345	AT5G12020	155	1,00E-38	17.6 KDA CLASS II HEAT SHOCK PROTEIN, HSP17.6II

ANEXO 6-3: PHYTOZOME

PHYTOZOME (<i>Prunus persica</i>)					nombre/descripción
SPOT	Locus	score	E value		
42					
59					
61					
65					
68	ppa001783m.g	1547	0	(M=2) 2.1.1.14 - 5-methyltetrahydropteroylglutamate-homocysteine S-methyltransferase	
89	ppa010473m.g	474,2	4,70E-170	(M=38) PF00314 - Thaumatin family	
90					
205	ppa005718m.g	823,9	0	(M=4) K03231 - elongation factor 1-alpha	
216	ppa005514m.g/Prupe.7.G161100.1	282,3	1,00E-89	(M=6) PF00257 - Dehydrin	
278					
284	ppa004763m.g	1024,6	0	(M=2) 1.11.1.6 - Catalase.	
322	ppa010326m.g	222,2	5,10E-71	(M=6) PF00257 - Dehydrin	
335	ppa004369m.g	850,9	0	(M=1) 2.6.1.19 - 4-aminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase	
440					
555	ppa007461m.g	564,3	0	Protein of unknown function (DUF642)	
600	ppa008791m.g	521,5	0	(M=4) 1.14.11.9//1.14.17.4 - Flavanone 3-dioxygenase. // Aminocyclopropane carbonyl oxidase.	
601	ppa008791m.g	605,1	0	(M=4) 1.14.11.9//1.14.17.4 - Flavanone 3-dioxygenase. // Aminocyclopropane carbonyl oxidase.	
631	ppa008712m.g	553,1	0	(M=18) PTHR11695:SF34 - ALCOHOL DEHYDROGENASE, ZINC-CONTAINING	
671					
835	ppa008791m.g	521,5	0	(M=4) 1.14.11.9//1.14.17.4 - Flavanone 3-dioxygenase. // Aminocyclopropane carbonyl oxidase.	
891					
943	ppa006924m.g	670,6	0	(M=1) 3.4.22.16 - Cathepsin H.	
981	ppa009328m.g	530,4	0	(M=26) 3.2.1.14 - Chitinase.	
1093	ppa012058m.g	380,6	3,10E-135	(M=1) K03098 - outer membrane lipoprotein Bbc	
1103	ppa011600m.g	384,8	2,50E-136	(M=5) K0G3135 - 1,4-benzoquinone reductase-like; Trp repressor binding protein-like/protoplact-secreted protein	
1312	ppa012646m.g	320,1	3,10E-112	(M=40) PF00407 - Pathogenesis-related protein Bet v I family	
1303	ppa012646m.g	320,1	3,10E-112	(M=40) PF00407 - Pathogenesis-related protein Bet v I family	
1345	ppa011156m.g	263,1	7,60E-90	(M=21) PTHR11527:SF14 - HEAT-SHOCK PROTEIN 17	

ANEXO 7.

Tabla resumen con los nombres asignados en cada base de datos.

[illegible]

..... termina mi danza invisible.

